

540,493

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
15 juillet 2004 (15.07.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/058815 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C07K 14/435, C12Q 1/68,

C12N 15/63, C07K 16/18, G01N 33/50, A01K 67/027,
A61K 48/00, 38/00, 39/00, C12N 15/12

Résidence Parc d'Alco, Appt 125, F-34080 Montpellier
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/003895

(74) Mandataire : **CABINET ORES**; 36 rue de St Péters-
bourg, F-75008 Paris (FR).

(22) Date de dépôt international :

24 décembre 2003 (24.12.2003)

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

02/16648 24 décembre 2002 (24.12.2002) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel-Ange, F-75794 Cedex
16 Paris (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **GIORGI,**
Dominique [FR/FR]; 391 rue du Mas du Juge, F-34980
Saint Gely du Fesc (FR). **ROQUIER, Sylvie** [FR/FR];
391 rue du Mas du Juge, F-34980 Saint Gely du Fesc (FR).
SAFFIN, Jean-Michel [FR/FR]; 59 rue Michel Teule,

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

BEST AVAILABLE COPY

(54) Title: NOVEL CENTROSOME-ASSOCIATED PROTEIN AND APPLICATIONS THEREOF

(54) Titre : NOUVELLE PROTEINE ASSOCIEE AUX CENTROSOMES ET SES APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to a novel centrosome-associated protein, to the polynucleotide coding for the aforementioned protein and to the applications of said protein and polynucleotide. The overexpression of the inventive protein disrupts the mitotic spindle assembly and leads to aberrant and abortive mitoses.

(57) Abrégé : L'invention est relative une nouvelle protéine associée aux centrosomes, au polynucléotide codant pour ladite protéine ainsi qu'aux applications de ladite protéine et dudit polynucléotide. La surexpression de la protéine selon l'invention entraîne des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et induit des mitoses aberrantes et abortives.

WO 2004/058815 A2

NOUVELLE PROTEINE ASSOCIEE AUX CENTROSOMES ET SES APPLICATIONS.

La présente Invention est relative à une nouvelle protéine associée aux centrosomes, au polynucléotide codant pour ladite protéine ainsi qu'aux applications de ladite protéine et dudit polynucléotide.

Le processus de division cellulaire consiste en une division nucléaire (mitose) suivie d'une division cytoplasmique (cytokinèse). La mitose est dominée par la formation d'un fuseau polaire très organisé (le fuseau mitotique) constitué de deux familles de microtubules : les microtubules polaires et les microtubules kinétochoriens. Les microtubules sont des polymères composés de sous-unités d' α - et β -tubuline. Leur croissance est initiée dans la région périphérique du centrosome par un complexe contenant majoritairement une protéine apparentée, la γ -tubuline. Les microtubules polaires sont composés de rangées de microtubules et de protéines associées qui sont mises en place par les deux centres mitotiques, associés à des centrioles, situés aux pôles opposés du fuseau (asters). Chaque chromosome répliqué est constitué de deux chromatides sœurs reliées entre elles par le centromère. Les microtubules kinétochoriens sont liés aux chromosomes répliqués par des structures spécialisées appelées kinétochores qui se forment au cours de la prophase sur chacune des deux faces du centromère. Les chromosomes se condensent pendant la prophase et forment les microtubules kinétochoriens qui commencent à interagir avec les microtubules polaires du fuseau après rupture de l'enveloppe nucléaire au cours de la prométaphase. Sous l'effet de la tension due aux forces opposées, dirigées vers les pôles qui tirent les microtubules kinétochoriens, les chromosomes s'alignent dans la zone équatoriale du fuseau pendant la métaphase. A l'anaphase, sous l'effet de forces continuellement développées au sein du fuseau mitotique, les chromatides sœurs se détachent et sont attirées vers les pôles opposés. Dans le même temps, les deux pôles cellulaires s'écartent. Au cours de la télophase, l'enveloppe nucléaire se reforme à la surface de chaque groupe de chromosomes.

La division cellulaire s'achève au moment où le contenu cytoplasmique est divisé selon le processus de cytokinèse. Le fuseau mitotique joue un rôle important dans le processus de cytokinèse, en fixant la mise en place de la segmentation cellulaire. Le sillon de division apparaît invariablement dans le plan de la plaque équatoriale, perpendiculairement à l'axe du fuseau mitotique.

Les processus décrits ci-dessus sont finement régulés par un équilibre entre des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation. Lorsque la cellule entre en mitose, des changements importants dans la phosphorylation des protéines interviennent. Le centrosome et le fuseau mitotique sont particulièrement enrichis en sites phosphorylés. De nombreuses protéine-kinases, particulièrement des sérine-thréonine-kinases, ont été décrites comme intervenant dans ces processus de phosphorylation (voir à cet égard Giet R. et Prigent C., J. Cell Science, 112, 3591-3601, 1999). Parmi celles-ci on citera celles localisées au niveau des centrosomes, parmi lesquelles les kinases de type aurora, requises pour la séparation des centrosomes et l'assemblage du fuseau mitotique, les kinases de type polo, impliquées dans la maturation et la formation du fuseau bipolaire et les kinases de type NIMA qui régulent la séparation des centrosomes.

Les mammifères possèdent au moins trois protéine-kinases du type aurora. Chez l'homme, ces trois protéine-kinases sont surexprimées dans des pathologies cancéreuses du fait d'anomalies chromosomiques. Ainsi, ces protéines semblent jouer un rôle important dans le contrôle de la ploïdie. Par exemple, une inactivation ou une surexpression de deux de ces kinases conduit à une polyploïdie. L'inhibition de l'activité de la kinase aurora A conduit à la formation de fuseaux monopolaires. L'inhibition de l'activité de la kinase aurora B conduit à la formation de cellules multinucléées par défaut de cytokinèse. Ces anomalies chromosomiques apparaissent liées à des perturbations dans la formation du fuseau mitotique.

Les partenaires et les substrats de ces protéine-kinases sont encore peu connus. Par exemple, chez le xénope, aurora A interagit avec une kinésine impliquée dans la dynamique des microtubules. Chez l'homme, elle

phosphoryle la protéine HsTACC-3, également surexprimée dans de nombreuses lignées de cellules cancéreuses. Chez la drosophile, aurora A phosphoryle la protéine D-TACC et est nécessaire à sa localisation aux centrosomes afin de réguler les microtubules astraux. D-TACC interagit avec
5 la protéine associée aux microtubules (MAP : Microtubule Associated Protein) Msp, qui fait partie de la famille des protéines XMAO215/ch-TOC/Msps, qui stimulent la croissance des microtubules *in vitro* et sont concentrées au niveau des centrosomes *in vivo*. D-TACC et Msp coopèrent pour stabiliser les centrosomes. Le terme MAP regroupe une collection de protéines variées
10 définies sur la base de leur capacité à interagir avec les microtubules. Les MAP apparaissent comme des partenaires/substrats des kinases du centrosome comme aurora ou polo.

Une division cellulaire correcte nécessite une coordination entre la ségrégation des chromosomes par le fuseau mitotique et le clivage de
15 la cellule par l'appareil de cytokinèse. Les microtubules du fuseau mitotique jouent un rôle essentiel dans les deux processus.

Cependant, malgré l'ensemble des travaux réalisés sur la division cellulaire, les facteurs intervenant dans une mise en place correcte du fuseau mitotique et/ou au contraire perturbant sa mise en place et/ou sa
20 structure, entraînant ainsi les conséquences ci-dessus décrites ne sont toujours pas connus.

Une telle connaissance permettrait d'une part de mieux comprendre les mécanismes de la mitose et d'autre part de pouvoir développer des moyens de lutter contre les anomalies de la division cellulaire et les
25 conséquences qu'elles entraînent.

C'est dans ce domaine que se place la présente Invention.

En effet, de manière surprenante et inattendue, les Inventeurs ont mis en évidence une nouvelle protéine humaine associée aux centrosomes. Par immunofluorescence, elle est détectée en colocalisation avec l' α -
30 tubuline des microtubules du fuseau mitotique, en particulier avec l'aster. Cette protéine a été nommée ASAP pour Aster Associated Protein (Protéine Associée à l'Aster) par les Inventeurs.

La surexpression de la protéine selon l'Invention entraîne des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et induit des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou multipolaires). Sa surexpression bloque la division cellulaire et par conséquent la prolifération cellulaire.

Ainsi, l'Invention a pour objet une protéine isolée, dénommée ASAP, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par :

a) une protéine répondant à la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1 ;

b) une protéine présentant, sur la totalité de sa séquence, au moins 80% d'identité ou au moins 90% de similarité, de préférence au moins 90 % d'identité ou au moins 95% de similarité, avec la protéine de SEQ ID NO: 1.

Une protéine conforme à l'Invention se caractérise par les propriétés suivantes :

- elle présente un poids moléculaire compris entre 60 et 100 kDa, de préférence entre 65 et 80 kDa ;
- elle est associée aux centrosomes ;
- elle est colocalisée par immunofluorescence avec l' α -tubuline des microtubules du fuseau mitotique ;
- elle présente une faible identité (23%) avec la protéine MAP1A (Microtubule Associated Protein 1A) ;
- elle présente des domaines coiled-coil essentiellement regroupés dans sa partie C-terminale entre les acides aminés 297 et 327 d'une part et 477 et 628 d'autre part, indiquant soit que la protéine s'oligomériser, soit qu'elle interagit avec d'autres protéines ;
- elle présente une faible identité (20%), entre les acides aminés 300 et 600 avec un domaine de type caldesmon (Gusev, N.B., Biochemistry, 10 : 1112-1121, 2000), référencé pfam00769 (NCBI, domains, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=pfam00769>), et, entre les acides aminés 480 et 630, avec un domaine de type ERM

(Ezrin/radixin/moesin ; Louvet-Vallet, S., Biol. Cell, 274 : 305-316, 2000), référencé pfam02029 (NCBI, domains, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=pfam02029>). Les protéines caldesmon et ERM sont également considérées comme des MAP ;

5 - elle présente également, entre les positions 65 et 303, un domaine BRCT, (Breast cancer carboxy-terminal domain ; Bork, P., et coll., FASEB J., 11, 68-76 (1997)), indiquant que la protéine est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire ;

 - elle présente une grande richesse en hélices α dans sa
10 partie C-terminale, en particulier dans la région comprise entre les acides aminés 420-620, presque exclusivement formée d'hélices α .

Ces éléments permettent de penser que la protéine ASAP est une nouvelle MAP.

 Les protéines selon l'invention incluent toute protéine (natu-
15 relle, synthétique, semi-synthétique ou recombinante) de n'importe quel organisme procaryote ou eucaryote, notamment d'un mammifère, comprenant ou consistant en une protéine ASAP. Préférentiellement, ladite protéine est une protéine ASAP fonctionnelle.

 On entend par "fonctionnelle", une protéine possédant une
20 activité biologique normale, c'est à dire capable d'intervenir dans l'organisation du fuseau mitotique et dans la division cellulaire. Cette protéine peut comprendre des mutations silencieuses n'induisant aucun changement substantiel dans son activité et ne produisant aucune modification phénotypique.

25 Des protéines conformes à l'invention sont notamment représentées par les protéines ASAP humaine (SEQ ID NO : 1) et murine (SEQ ID NO : 46).

 Sont incluses dans les protéines selon l'invention définies en
b), les protéines variantes des séquences SEQ ID NO: 1 et 46, en particulier
30 les protéines dont la séquence en acides aminés présente au moins une mutation correspondant notamment à une troncation, une délétion, une substitution et/ou une addition d'au moins un résidu d'acide aminé par rapport

aux séquences SEQ ID NO: 1 et 46.

De manière préférée, les protéines variantes présentent une mutation entraînant un dysfonctionnement (activation ou inhibition) de la protéine, d'autres gènes ou protéines ou encore de la cellule en général.

5 Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'Invention, ladite protéine est une protéine de mammifère, préférentiellement une protéine d'origine humaine.

Au sens de la présente Invention les définitions suivantes s'appliquent.

10 L'identité d'une séquence par rapport à la séquence de SEQ ID NO :1 comme séquence de référence s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus d'acides aminés qui sont identiques, lorsque les deux séquences sont alignées, de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles.

15 Le pourcentage d'identité peut être calculé par l'Homme du métier en utilisant un programme informatique de comparaison de séquences tel que, par exemple celui de la suite BLAST (Altschul et al., NAR, 1997, 25, 3389-3402).

20 Les programmes BLAST sont mis en œuvre sur la fenêtre de comparaison constituée par la totalité de la SEQ ID NO :1, indiquée comme séquence de référence.

Une protéine ayant une séquence en acides aminés ayant au moins X % d'identité avec une séquence de référence est définie, dans la présente Invention comme une protéine dont la séquence peut inclure jusqu'à
25 100-X altérations pour 100 acides aminés de la séquence de référence, tout en conservant les propriétés fonctionnelles de ladite protéine de référence. Au sens de la présente Invention, le terme altération inclut les délétions, les substitutions ou les insertions consécutives ou dispersées d'acides aminés dans la séquence de référence.

30 La similarité d'une séquence par rapport à une séquence de référence s'apprécie en fonction du pourcentage de résidus d'acides aminés qui sont identiques ou qui diffèrent par des substitutions conservatives,

lorsque les deux séquences sont alignées de manière à obtenir le maximum de correspondance entre elles. Au sens de la présente Invention, on entend par substitution conservative, la substitution d'un acide aminé par un autre qui présente des propriétés chimiques ou physiques similaires (taille, charge ou polarité), qui généralement ne modifie pas les propriétés fonctionnelles de la protéine.

Une protéine ayant une séquence en acides aminés ayant au moins X % de similarité avec une séquence de référence est définie, dans la présente Invention comme une protéine dont la séquence peut inclure jusqu'à 100-X altérations non-conservatives pour 100 acides aminés de la séquence de référence. Au sens de la présente Invention, le terme altérations non-conservatives inclut les délétions, les substitutions non-conservatives ou les insertions consécutives ou dispersées d'acides aminés dans la séquence de référence.

Par "techniques ou méthodes bien connues de l'homme du métier" on entend ici se référer aux techniques ou méthodes classiquement utilisées par l'homme du métier et exposées dans de nombreux ouvrages, comme en particulier celui intitulé Molecular Cloning. A Laboratory Manual (Sambrook J, Russell DW. (2000) Cold Spring Harbor Laboratory Press).

La protéine selon l'Invention est obtenue soit à partir d'une cellule, soit par synthèse chimique, soit par recombinaison génétique.

Par synthèse chimique, la protéine peut être obtenue en utilisant l'une des nombreuses voies de synthèses peptidiques connues, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides ou des techniques utilisant des phases solides partielles, par condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique. Dans ce cas, la séquence de la protéine peut être modifiée afin d'améliorer sa solubilité, en particulier dans les solvants aqueux. De telles modifications sont connues de l'homme du métier comme par exemple la délétion de domaines hydrophobes ou la substitution d'acides aminés hydrophobes par des acides aminés hydrophiles.

La protéine selon l'Invention est constituée de l'enchaînement de 13 peptides correspondants aux produits de traduction de 13 des 14 exons

que comporte le gène correspondant, le premier exon n'étant pas traduit (voir ci-après).

De manière plus précise, lesdits peptides répondent aux séquences suivantes (positions données par rapport à la numérotation de la séquence SEQ ID NO: 1) :

- Peptide 1 : il comprend 25 acides aminés correspondants aux positions 1 à 25 (SEQ ID NO: 2) ;
- Peptide 2 : il comprend 28 acides aminés correspondants aux positions 26 à 53 (SEQ ID NO: 3) ;
- Peptide 3 : il comprend 107 acides aminés correspondants aux positions 54 à 160 (SEQ ID NO: 4) ;
- Peptide 4 : il comprend 76 acides aminés correspondants aux positions 161 à 236 (SEQ ID NO: 5) ;
- Peptide 5 : il comprend 31 acides aminés correspondants aux positions 237 à 267 (SEQ ID NO: 6) ;
- Peptide 6 : il comprend 83 acides aminés correspondants aux positions 268 à 350 (SEQ ID NO: 7) ;
- Peptide 7 : il comprend 24 acides aminés correspondants aux positions 351 à 374 (SEQ ID NO: 8) ;
- Peptide 8 : il comprend 54 acides aminés correspondants aux positions 375 à 428 (SEQ ID NO: 9) ;
- Peptide 9 : il comprend 32 acides aminés correspondants aux positions 429 à 460 (SEQ ID NO: 10) ;
- Peptide 10 : il comprend 54 acides aminés correspondants aux positions 461 à 514 (SEQ ID NO: 11) ;
- Peptide 11 : il comprend 49 acides aminés correspondants aux positions 515 à 563 (SEQ ID NO: 12) ;
- Peptide 12 : il comprend 43 acides aminés correspondants aux positions 564 à 606 (SEQ ID NO: 13) ;
- Peptide 13 : il comprend 41 acides aminés correspondants aux positions 607 à 647 (SEQ ID NO: 14).

La présente Invention a aussi pour objet un peptide constitué d'un fragment d'au moins 10 acides aminés consécutifs d'une protéine définie ci-dessus en a) ou b), particulièrement un peptide sélectionné parmi :

- les séquences correspondant aux peptides 1 à 13 décrits ci-dessus, c'est-à-dire sélectionné parmi les séquences SEQ ID NO: 2 à SEQ ID NO: 14, et

- les séquences SEQ ID NO : 47 à 53 correspondant à des mutants de la protéine hASAP délétés de la partie N-terminale contenant le domaine BRCT (Ndel1 : résidus 304 -647 (SEQ ID NO: 48) ; Ndel2 : résidus 411-647 (SEQ ID NO : 49) ; Ndel3 : résidus 478-647 (SEQ ID NO : 50)) ou de la partie C-terminale contenant le domaine MAP (Cdel1 : résidus 1 à 477 (SEQ ID NO: 51) ; Cdel2 : résidus 1 à 418 (SEQ ID NO: 52) ; Cdel3 : résidus 1 à 303 (SEQ ID NO: 53) ; résidus 1 à 421 (SEQ ID NO: 47)).

Selon un mode de réalisation avantageux de l'Invention, ledit peptide est utile pour la production d'anticorps reconnaissant spécifiquement une protéine telle que définie ci-dessus, préférentiellement reconnaissant la protéine ASAP de séquence SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 46.

L'Invention a ainsi également pour objet des anticorps monoclonaux ou polyclonaux, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement une protéine selon l'Invention.

De manière préférentielle selon l'Invention, les anticorps reconnaissent, parmi les MAPs, uniquement et spécifiquement la protéine ASAP de séquence SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 46.

Les anticorps selon l'Invention sont, par exemple, des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab ou F(ab')₂. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués afin d'obtenir un signal délectable et/ou quantifiable.

Lesdits anticorps peuvent être obtenus directement à partir de sérum humain ou à partir de sérum d'animaux immunisés avec les protéines ou les peptides selon l'Invention. Les anticorps polyclonaux ou monoclonaux spécifiques peuvent être obtenus selon les techniques bien connues de l'Homme du Métier.

L'Invention a également pour objet l'utilisation des anticorps selon l'Invention pour la détection et/ou la purification d'une protéine selon l'Invention.

De manière générale, les anticorps selon l'Invention peuvent être avantageusement utilisés pour détecter la présence d'une protéine selon l'Invention, normale ou mutée.

Particulièrement, les anticorps monoclonaux, peuvent être utilisés pour la détection de ces protéines dans un échantillon biologique. Ils constituent ainsi un moyen d'analyse immunocytochimique ou immunohistochimique de l'expression des protéines selon l'Invention, notamment la protéine de séquence SEQ ID NO: 1, sur des coupes de tissus. Généralement pour de telles analyses, les anticorps utilisés sont marqués afin d'être détectables par exemple par des composés immunofluorescents, par marquage à l'or ou sous forme d'immunoconjugués enzymatiques.

Ils peuvent permettre notamment de mettre en évidence une expression anormale de ces protéines dans les tissus ou prélèvements biologiques et ainsi permettre la détection de cellules présentant des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou une induction des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou multipolaires) liées à la surexpression de la protéine selon l'Invention.

L'Invention a également pour objet une méthode de détection dans un échantillon biologique de la protéine selon l'Invention, particulièrement de la protéine ASAP, comprenant une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire, une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'Invention et une troisième étape de mise en évidence par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé.

Cette méthode peut en outre permettre de mesurer le taux d'expression de la protéine selon l'Invention dans des cellules, particulièrement dans des cellules cancéreuses. L'étude de l'expression de la protéine ASAP (sur- ou sous-expression) est un élément d'évaluation de la capacité de

prolifération ou d'agressivité (capacité à évoluer vers des cancers de mauvais pronostic) de cellules cancéreuses.

L'Invention a donc également pour objet une méthode d'évaluation *in vitro* de la capacité de prolifération ou d'agressivité des cellules cancéreuses contenues dans un échantillon biologique, caractérisée en ce qu'elle comprend une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire, une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'Invention, une troisième étape de mise en évidence et/ou de mesure par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé et une quatrième étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison du taux de complexes protéine ASAP-anticorps formés à celui d'un échantillon biologique témoin préalablement choisi. Ledit témoin peut être constitué par exemple par un échantillon biologique contenant des cellules présentant un taux de protéines normal ou altéré, auquel ladite méthode est appliquée dans les mêmes conditions.

L'Invention a également pour objet une trousse permettant de mettre en œuvre l'une quelconque des méthodes ci-dessus décrites comprenant :

- a) au moins un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'Invention ;
- b) les réactifs permettant la détection du complexe protéine ASAP-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

Selon un mode de réalisation particulier de l'Invention, la trousse peut éventuellement comprendre des réactifs nécessaires pour rendre accessible le milieu intracellulaire.

Par moyen pour rendre accessible le milieu intracellulaire, on entend tout moyen connu de l'Homme du Métier comme par exemple la lyse cellulaire par voie enzymatique, chimique ou encore la sonication, la perméabilisation membranaire, les chocs thermiques.

La présente Invention a également pour objet un polynucléotide isolé (ADNc ou fragment d'ADN génomique), caractérisé en ce que sa séquence est sélectionnée dans le groupe constitué par :

- les séquences codant pour une protéine ou un peptide
- 5 tels que définis ci-dessus, et
- les séquences complémentaires des précédentes, sens ou anti-sens.

L'Invention englobe, les allèles du gène *asap* issus de n'importe quel mammifère, ainsi que les polynucléotides des mutants naturels

10 ou artificiels du gène *asap* codant pour une protéine ASAP, particulièrement pour une protéine ASAP fonctionnelle telle que définie ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'Invention, ledit polynucléotide codant pour une protéine ASAP répond à une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par :

- 15 - la séquence SEQ ID NO: 15, correspondant à l'ADN complémentaire de 2575 nucléotides de l'ARNm codant pour la protéine ASAP humaine (hASAP) ;
- la séquence SEQ ID NO: 45, correspondant à l'ADN complémentaire de 2767 nucléotides de l'ARNm codant pour la protéine
- 20 ASAP murine (mASAP)
- le fragment d'ADN génomique de 29750 nucléotides répondant à la séquence représentée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 16, correspondant au gène *asap* humain comprenant 14 exons dont 13 seulement sont traduits, le premier exon n'étant
- 25 pas traduit, contenue dans le contig AC097467 (longueur 178204 paires de bases) entre les bases 115117 et 143828 (version v.7.29a3 NCBI/Ensembl du 12 juillet 2002, <http://www.ensembl.org>), par ailleurs localisée sur le chromosome 4q32.1 entre les marqueurs anonymes D4S1053 et D4S571 (région 161,25 Mégabases (Mb) à 161,28 Mb).

30 La séquence SEQ ID NO: 16 est contenue dans le clone BAC RP11-27G13 (Osoegawa, K., et col., (2001) A Bacterial Artificial Chromosome Library for Sequencing the Complete Human Genome, Genome Research,

Vol. 11, n°3, 483-496, mars 2001). Les séquences contenues dans le contig AC097467 et dans le clone BAC RP11-27G13 ont été obtenues dans le cadre du programme de séquençage du génome humain et n'ont jusqu'à présent fait l'objet d'aucune reconnaissance ni caractérisation précises permettant de leur attribuer une quelconque fonction. Deux acides nucléiques correspondants à des fragments du polynucléotide isolé par les Inventeurs sont répertoriés dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812, ainsi que les EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AWW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952. Ces séquences, obtenues dans le cadre d'un programme de séquençage en masse de banques d'ADN complémentaires humains, sont incomplètes et n'ont jamais été ni reconnues ni caractérisées. En fait, le polynucléotide isolé par les Inventeurs présente de longs enchaînements de désoxyadénosines (poly-dA), ce qui explique les difficultés rencontrées par les Inventeurs pour obtenir l'ADNc complet par utilisation d'amorces oligo-désoxythymidines (oligo-dT) classiques, celles-ci s'hybridant

de manière aléatoire avec les enchaînements poly-dA. C'est par l'utilisation répétée de la technique de l'amplification rapide des extrémités 3' d'ADNc (3' Rapid Amplification cDNA end ou 3'RACE) que les Inventeurs sont parvenus à isoler le polynucléotide correspondant à l'ARNm complet.

5 L'ARNm, correspondant au polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 15, est spécifiquement exprimé dans le testicule sous la forme d'un polynucléotide d'une longueur d'environ 2,9 kilobases et dans le cerveau sous la forme d'un polynucléotide d'une longueur d'environ 9 kilobases pouvant correspondre soit à un pré-messager soit à une isoforme de haut poids moléculaire.

De manière plus précise, lesdits exons sont répartis comme suit sur ladite séquence génomique (par rapport à la numérotation de la séquence SEQ ID NO: 16) :

- 15 - exon 1 : il comprend 200 paires de bases correspondant aux positions 101 à 300 (SEQ ID NO: 17) ;
- exon 2 : il comprend 139 paires de bases correspondant aux positions 1157 à 1295 (SEQ ID NO: 18) ;
- exon 3 : il comprend 85 paires de bases correspondant aux positions 2050 à 2134 (SEQ ID NO: 19) ;
- 20 - exon 4 : il comprend 321 paires de bases correspondant aux positions 3615 à 3935 (SEQ ID NO: 20) ;
- exon 5 : il comprend 227 paires de bases correspondant aux positions 8259 à 8485 (SEQ ID NO: 21) ;
- exon 6 : il comprend 94 paires de bases correspondant aux positions 14930 à 15023 (SEQ ID NO: 22) ;
- 25 - exon 7 : il comprend 248 paires de bases correspondant aux positions 16715 à 16962 (SEQ ID NO: 23) ;
- exon 8 : il comprend 71 paires de bases correspondant aux positions 19552 à 19622 (SEQ ID NO: 24) ;
- 30 - exon 9 : il comprend 169 paires de bases correspondant aux positions 21187 à 21355 (SEQ ID NO: 25) ;

- exon 10 : il comprend 90 paires de bases correspondant aux positions 21911 à 22000 (SEQ ID NO: 26) ;
- exon 11 : il comprend 162 paires de bases correspondant aux positions 23731 à 23892 (SEQ ID NO: 27) ;
- 5 - exon 12 : il comprend 146 paires de bases correspondant aux positions 24014 à 24159 (SEQ ID NO: 28) ;
- exon 13 : il comprend 133 paires de bases correspondant aux positions 24343 à 24475 (SEQ ID NO: 29) ;
- exon 14 : il comprend 485 paires de bases correspondant aux positions 29166 à 29650 (SEQ ID NO: 30).

L'invention a aussi pour objet :

- un fragment de l'un quelconque des polynucléotides selon l'invention, d'au moins 15 à 1500 nucléotides consécutifs à l'exclusion des séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et
- 15 des EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132,
- 20 AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293,
- 25 BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418,
- 30 BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans

la base de données GenBank, particulièrement un fragment sélectionné parmi les séquences correspondants aux exons c'est-à-dire sélectionné parmi les séquences SEQ ID NO: 16 à SEQ ID NO: 30 ;

- un acide nucléique présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence d'au moins 90 %, avec l'un des polynucléotides selon l'Invention.

La définition de l'identité d'une séquence donnée précédemment pour les protéines, s'applique par analogie aux molécules d'acide nucléique.

- 10 Sont inclus dans un polynucléotide présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence au moins 90 %, selon l'Invention, les polynucléotides variants des séquences SEQ ID NO: 15 et 45, c'est-à-dire l'ensemble des polynucléotides correspondants à des variants alléliques, c'est-à-dire à des variations individuelles des séquences SEQ ID NO: 15 et
- 15 45. Ces séquences variantes naturelles correspondent à des polymorphismes présents chez les mammifères, en particulier chez l'être humain et, notamment à des polymorphismes pouvant conduire à la survenue d'une pathologie.

- On entend également désigner par polynucléotide variant, tout ARN ou ADNc résultant d'une mutation et/ou d'une variation d'un site d'épissage de la séquence génomique dont l'ARNm a comme ADN complémentaire le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 15 ou SEQ ID NO : 45.
- 20

- De préférence, la présente Invention concerne les polynucléotides ou les fragments variants des séquences SEQ ID NO: 15 et 45, particulièrement ceux dans lesquelles les mutations conduisent à une modification de la séquence en acides aminés des protéines de séquence SEQ ID NO: 1 et SEQ ID NO : 46.
- 25

- Les polynucléotides selon l'Invention peuvent être isolés à partir de cellules, particulièrement des cellules de testicule ou de cerveau ou à partir de banques d'ADN cellulaire. Ils peuvent également être obtenus par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) effectuée sur l'ADN total des cellules ou encore par RT-PCR effectuée sur les ARN totaux des cellules ou par synthèse chimique.
- 30

Les polynucléotides selon l'invention, particulièrement les fragments de l'un quelconque des polynucléotides selon l'invention, et les séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et les EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, 5 AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, 10 BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, 15 BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, 20 BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans la base de données GenBank ou leurs fragments, peuvent notamment être utilisés comme sondes ou comme amorces pour détecter/amplifier des polynucléotides (ARN ou ADN génomique) correspondants au polynucléotide 25 selon l'invention, particulièrement dans d'autres organismes.

Les transcrits du gène *asap* sont par exemple de préférence mis en évidence à l'aide de sondes sélectionnées dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 17 à SEQ ID NO: 44 ou à l'aide d'un EST tel que défini ci-dessus ou amplifiés par RT-PCR à l'aide d'amorces sélectionnées dans le groupe constitué par les 30 séquences SEQ ID NO: 31 à 43.

Le polynucléotide selon l'invention peut permettre de diagnostiquer un état pathologique ou une maladie génétique impliquant un dysfonctionnement du gène *asap* et de cribler des substances capables de moduler (activer ou inhiber) la transcription dudit gène.

5 L'invention a aussi pour objet les polynucléotides susceptibles d'être obtenus par amplification à l'aide des amorces selon l'invention.

Les sondes et amorces selon l'invention peuvent être marquées directement ou indirectement par un composé radioactif ou non radioactif par des méthodes bien connues de l'homme du métier, afin d'obtenir
10 un signal délectable et/ou quantifiable.

Le marquage des sondes selon l'invention est réalisé par des éléments radioactifs ou par des molécules non radioactives. Parmi les isotopes radioactifs utilisés, on peut citer le ^{32}P , le ^{33}P , le ^{35}S , le ^3H ou l' ^{125}I . Les entités non radioactives sont sélectionnées parmi les ligands tels que la
15 biotine, l'avidine, la streptavidine, la digoxygénine, les haptènes, les colorants, les agents luminescents tels que les agents radioluminescents, chémo-luminescents, bioluminescents, fluorescents, phosphorescents.

Les polynucléotides selon l'invention peuvent ainsi être utilisés comme amorce et/ou sonde dans des procédés mettant en œuvre
20 notamment la technique de PCR (amplification en chaîne par polymérase) (U.S. N° 4,683,202). D'autres techniques d'amplification de l'acide nucléique cible peuvent être avantageusement employées comme alternative à la PCR. Il existe actuellement de très nombreux procédés permettant cette amplification, comme par exemple la technique SDA (Strand Displacement Amplifica-
25 tion) ou technique d'amplification à déplacement de brin, la technique TAS (Transcription-based Amplification System), la technique 3SR (Self-Sustained Sequence Replication), la technique NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), la technique TMA (Transcription Mediated Amplification), la technique LCR (Ligase Chain Reaction), la technique de RCR (Repair Chain
30 Reaction), la technique CPR (Cycling Probe Reaction), la technique d'amplification à la Q- β -réplicase. On peut encore citer la PCR-SSCP qui permet de détecter des mutations ponctuelles.

Ces techniques sont bien entendu parfaitement connues de l'homme du métier.

Comme sondes ou comme amorces, les différents polynucléotides selon l'invention peuvent permettre, soit de déterminer le profil de transcription du gène *asap* correspondant ou une éventuelle altération de ce profil dans un échantillon biologique, soit de mettre en évidence le gène correspondant dans d'autres espèces, des variants alléliques de ce gène ou une éventuelle altération fonctionnelle de ce gène (changement substantiel dans l'activité de la protéine codée par ledit gène) résultant d'une mutation (insertion, délétion ou substitution) d'un ou plusieurs nucléotides au niveau d'au moins un exon dudit gène. De telles mutations incluent en particulier les délétions, les insertions ou les substitutions non-conservatives au niveau de codons correspondant à des résidus d'acides aminés situés dans un domaine essentiel pour l'activité biologique de la protéine.

Ainsi l'invention a pour objet une méthode de détermination du profil de transcription du gène correspondant au polynucléotide selon l'invention ou d'une altération dudit profil, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié des ARN totaux à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ARN avec une sonde selon l'invention, préalablement marquée, dans des conditions classiques d'hybridation entre les ARN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

Par conditions classiques d'hybridation, on entend celles décrites dans Sambrook J, Russell DW. (2000) Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Selon un mode de mise en œuvre de ladite méthode, la deuxième étape peut être une étape de transcription inverse et d'amplification des transcrits, réalisée à l'aide d'une paire d'amorces telles que décrites précédemment et la troisième étape, une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés.

Ladite méthode de détermination du profil de transcription du gène peut en outre comporter une étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison avec un échantillon témoin préalablement choisi. Ledit témoin peut être constitué par exemple par un échantillon biologique
5 présentant une transcription normale ou altérée du gène correspondant au polynucléotide selon l'invention auquel ladite méthode de détermination du profil de transcription du gène est appliquée dans les mêmes conditions.

L'invention a aussi pour objet une méthode de mise en évidence dans d'autres espèces du gène correspondant au polynucléotide
10 selon l'invention ou des variants alléliques dudit gène ou d'une altération fonctionnelle de ce gène, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié de l'ADN à partir des cellules d'un échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ADN avec une sonde selon l'invention, préalablement marquée, dans
15 des conditions classiques d'hybridation entre les ADN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

Selon un mode de mise en œuvre de ladite méthode, la deuxième étape peut être une étape d'amplification réalisée à l'aide d'une paire d'amorces telles que décrites précédemment et la troisième étape, une
20 étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés. La méthode peut éventuellement comporter une quatrième étape d'isolement et de séquençage des acides nucléiques mis en évidence.

L'invention a également pour objet une trousse de réactifs pour la mise en œuvre des méthodes précédemment décrites comprenant :

25 a) au moins une sonde ou une paire d'amorces selon l'invention ;

b) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction classique d'hybridation entre ladite sonde ou lesdites amorces et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ;

30 c) les réactifs nécessaires à la mise en œuvre d'une réaction d'amplification ;

d) les réactifs nécessaires à la détection et/ou au dosage de l'hybride formé entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ou des acides nucléiques amplifiés formés.

5 Une telle trousse peut également contenir des contrôles positifs ou négatifs afin d'assurer la qualité des résultats obtenus. Elle peut également contenir les réactifs nécessaires à la purification des acides nucléiques à partir de l'échantillon biologique.

Le polynucléotide de l'invention ou un de ses fragments, ainsi que les EST décrits précédemment ou leur fragments peuvent servir à la mise au point de
10 modèles cellulaires ou animaux n'exprimant pas la protéine ASAP, en invalidant le gène *ASAP* par la méthode de Si RNA (ou RNAi pour RNA interference ; M. McManus and P. Sharp, Nature Reviews Genetics, 3, 737-747, 2002 ; V. Brondani, F. Kolb, E. Billy, M/S, 6-7, 665-667, 2002) à l'aide d'oligonucléotides dérivés de leurs séquences.

15 L'invention a également pour objet un vecteur de clonage et/ou d'expression dans lequel est inséré le polynucléotide selon l'invention.

Un tel vecteur peut contenir les éléments nécessaires à l'expression et éventuellement à la sécrétion de la protéine dans une cellule hôte.

20 Lesdits vecteurs comportent de préférence : un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Ils doivent pouvoir être maintenus de façon stable dans la cellule et peuvent éventuellement comprendre des séquences codant pour des signaux particuliers spécifiant la
25 sécrétion de la protéine traduite tels que par exemple un promoteur fort de nature ubiquitaire ou un promoteur sélectif d'un type de cellule et/ou de tissu particulier. Ces différentes séquences de contrôle sont choisies en fonction de l'hôte cellulaire utilisé.

Le polynucléotide selon l'invention peut être inséré dans des
30 vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi.

Parmi les systèmes à réplication autonome, on utilise de préférence en fonction de la cellule hôte, des systèmes de type plasmidique ou viral. Les vecteurs viraux peuvent notamment être des adénovirus, des rétrovirus, des lentivirus, des poxvirus ou des virus herpétiques. L'homme du
5 métier connaît les technologies utilisables pour chacun de ces systèmes.

Lorsque l'on souhaite l'intégration de la séquence dans les chromosomes de la cellule hôte, on peut utiliser par exemple des systèmes de type plasmidique ou viral ; de tels virus sont, par exemple, les rétrovirus ou les virus associés aux adénovirus (Adeno-associated virus ou AAV).

10 Parmi les vecteurs non viraux, on préfère les polynucléotides nus tels que l'ADN ou l'ARN nu, les chromosomes artificiels de bactérie (BAC, bacterial artificial chromosome), les chromosomes artificiels de levure (YAC, yeast artificial chromosome) pour l'expression dans la levure, les chromosomes artificiels de souris (MAC, mouse artificial chromosome) pour l'expres-
15 sion dans les cellules murines et de manière préférée les chromosomes artificiels d'homme (HAC, human artificial chromosome) pour l'expression dans les cellules humaines.

De tels vecteurs sont préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les vecteurs recombinants en résultant peuvent être introduits dans l'hôte approprié par des méthodes standards,
20 telles que par exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, la transformation après perméabilisation chimique de la membrane, la fusion cellulaire.

L'Invention a aussi pour objet les cellules hôtes transformées, notamment les cellules eucaryotes et procaryotes, dans lesquelles au moins un polynucléotide ou un fragment selon l'Invention ou au moins un vecteur selon l'Invention a été introduit.

Parmi les cellules utilisables aux sens de la présente Invention, on peut citer les cellules bactériennes, les cellules de levure, les
30 cellules animales, en particulier les cellules de mammifères ou encore les cellules végétales. On peut citer également les cellules d'insectes dans

lesquelles on peut utiliser des procédés mettant par exemple en oeuvre des baculovirus.

L'Invention a également pour objet les organismes transgéniques non-humains tels que les animaux ou les végétaux transgéniques, dont tout ou partie des cellules contient le polynucléotide selon l'Invention ou le vecteur selon l'Invention, sous une forme libre ou intégrée.

De préférence selon l'Invention, les organismes transgéniques non-humains sont ceux porteurs de cellules contenant un polynucléotide selon l'Invention, non fonctionnel ou porteur d'une mutation.

Selon l'Invention les animaux transgéniques sont de préférence des mammifères, excepté l'homme, plus préférentiellement les rongeurs, en particulier les souris ou les rats.

Les animaux transgéniques peuvent être obtenus par toute méthode classique connue de l'homme du métier, comme par exemple par recombinaison homologue sur cellules souches embryonnaires, transfert de ces cellules souches à des embryons, sélection des chimères affectées au niveau des lignées reproductrices, et croissance desdites chimères.

Les cellules hôtes transformées, les animaux ou les végétaux transgéniques selon l'Invention peuvent ainsi exprimer ou surexprimer le gène codant pour la protéine selon l'Invention ou leur gène homologue ou exprimer ledit gène dans lequel est introduite une mutation.

Les cellules de testicule ou de cerveau, les cellules hôtes transformées ou les organismes transgéniques selon l'Invention peuvent être utilisés pour la préparation de la protéine selon l'Invention.

La protéine selon l'Invention, particulièrement la protéine ASAP native, peut être purifiée selon les techniques connues de l'homme du métier. Ainsi, la protéine peut être purifiée à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, particulièrement de chromatographie d'affinité, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux spécifiques, etc...

L'Invention a également pour objet une méthode de préparation de la protéine ASAP, se caractérisant en ce que l'on cultive des cellules exprimant la protéine ou des cellules transformées selon la présente Invention, notamment les cellules de mammifères ou les cellules d'organismes transgéniques selon l'Invention, dans des conditions permettant l'expression de ladite protéine, et que l'on purifie ladite protéine.

Comme technique de purification, on peut citer par exemple la chromatographie d'affinité sur glutathione-sépharose (ou agarose) telle que décrite dans Sambrook J & Russell DW. (2000, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

L'Invention a également pour objet une protéine, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par l'une quelconque des méthodes de préparation ci-dessus décrites.

L'Invention a encore pour objet une méthode de criblage d'une substance capable d'interagir *in vitro*, directement ou indirectement, avec le polynucléotide ou la protéine selon l'Invention caractérisée en ce que :

- dans une première étape on met en contact la substance à tester et le polynucléotide ou la protéine selon l'Invention et
- dans une deuxième étape on détecte par tout moyen approprié le complexe formé entre ladite substance et le polynucléotide ou la protéine selon l'Invention.

La présente invention a également pour objet une méthode de criblage d'une substance capable de moduler (activer ou inhiber) l'activité de la protéine ASAP, caractérisée en ce que :

- dans une première étape on met en contact des cellules d'un échantillon biologique exprimant la protéine ASAP avec une substance à tester,
- dans une deuxième étape on mesure par tout moyen approprié l'effet de ladite substance sur l'activité de ladite protéine ASAP, et
- dans une troisième étape on sélectionne des substances capables de moduler ladite activité.

Au sens de la présente invention, on entend par activité de la protéine ASAP, aussi bien l'expression de la protéine ASAP ou des transcrits (ARNm) correspondants, que l'activité biologique de ladite protéine ASAP, comme par exemple son effet sur l'organisation du fuseau mitotique ou l'induction de mitoses aberrantes et abortives.

La détection du complexe formé entre ladite substance et le polynucléotide ou la protéine ou la mesure de l'effet de ladite substance sur l'activité de ladite protéine ASAP peuvent être réalisées par les techniques classiques d'analyse d'ARNm ou de protéines qui sont connues en elles-mêmes ; à titre d'exemple non-limitatif, on peut citer les techniques suivantes : RT-PCR, Northern-blot, Western-blot, RIA, ELISA, immunoprécipitation, techniques d'analyse immunocytochimique ou immunohistochimique.

Avantageusement, ladite mesure est réalisée à l'aide des sondes, des amorces ou des anticorps, tels que définis ci-dessus.

De telles substances peuvent être des macromolécules biologiques comme par exemple un acide nucléique, un lipide, un sucre, une protéine, un peptide, un composé hybride protéine-lipide, protéine-sucre, peptide-lipide ou peptide-sucre, une protéine ou un peptide sur lequel on a ajouté des ramifications chimiques ou encore des molécules chimiques.

L'invention a également pour objet le polynucléotide, la protéine, les anticorps, les vecteurs ou les cellules transformées selon l'invention, utilisés comme médicaments.

Comme indiqué précédemment, la surexpression de la protéine selon l'invention bloque la division cellulaire et par conséquent la prolifération cellulaire. Cela en fait un excellent candidat pour une utilisation comme agent anti-mitotique, utilisable par exemple dans le traitement des pathologies cancéreuses.

Ainsi, l'invention a également pour objet l'utilisation du polynucléotide, d'un vecteur ou de la protéine selon l'invention, dans la préparation d'un médicament anti-mitotique.

De même comme il est également indiqué précédemment, la surexpression de la protéine selon l'invention entraîne des perturbations dans

l'organisation du fuseau mitotique et induit des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou multipolaires).

Ainsi, l'invention a aussi pour objet l'utilisation d'un polynucléotide anti-sens ou d'un fragment anti-sens, d'un anticorps, d'un vecteur
5 contenant un oligonucléotide anti-sens selon l'invention, capables d'inhiber l'expression du polynucléotide ou de la protéine selon l'invention, dans la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies liées aux perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou à une induction des mitoses aberrantes et abortives (cellules plurinucléées, fuseaux mono- ou
10 multipolaires) liées à la surexpression de la protéine selon l'invention.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de l'invention ainsi qu'aux
dessins annexés, dans lesquels :

15 - La Figure 1 représente la localisation chromosomique et la structure du gène *asap* humain.

- La Figure 2 représente les signaux obtenus par Northern blots sur différents tissus humains après hybridation avec une sonde hASAP.

- La Figure 3 représente les résultats obtenus :

20 (A) par électrophorèse sur gel d'agarose des produits de RT-PCR obtenus avec des amorces correspondant au polynucléotide de souris, orthologue du polynucléotide SEQ ID NO: 15, à partir de différents tissus de souris.

(B) Après transfert du gel après électrophorèse sur une
25 membrane et hybridation avec une sonde mASAP interne.

- La Figure 4 représente la localisation cellulaire de la protéine hASAP couplée à la Green Fluorescent Protein (GFP) en 3' ou la Yellow Fluorescent Protein (YFP) en 5' ou à un tag MYC du côté N-terminal (colonne
fusion).

30 Les noyaux sont colorés à l'iodure de propidium ou au Hoechst 33286. (4A : objectif 63x ; 4B, 4C, 4D : objectif 100X).

- La Figure 5 montre la co-localisation de la protéine ASAP

humaine avec l'alpha-tubuline. Figure 5 A : localisation cellulaire de l'alpha-tubuline, Figure 5 B : localisation de la protéine ASAP, Figure 5 C : superposition des 2 images montrant la colocalisation des 2 protéines.

Les exemples suivants sont illustratifs de l'invention et ne la limitent aucunement.

EXEMPLE 1 : Construction de la séquence codante ASAP complète :

On amplifie la séquence complète de l'ADNc de la protéine ASAP à partir de 2 fragments chevauchants :

- un fragment A amplifié par PCR à partir du clone AI885274 avec les amorces :

constFIS-1F (5'-ATGTCTGATGAAGTTTTAGCACC-3') (SEQ ID NO: 31) et

constFIS-2R (5'-AGGCCTCAAATGATGCTAATGC-3') (SEQ ID NO: 32) ;

- un fragment B amplifié à partir du clone AI671785 avec les amorces :

constFIS-2F (5'-ATCATTTGAGGCCTGGAAGGC-3') (SEQ ID NO: 33) et

et constFIS-1R (5'-AAACACTTTTGCGAACACAGTTC-3') (SEQ ID NO: 34).

Puis, pour obtenir un produit PCR unique correspondant à la séquence complète de l'ADNc de la protéine ASAP, utilisable pour les expériences de fonction, 0,5 µl des produits de chacune des 2 réactions PCR (fragment A et B) sont hybridés ensemble à 25°C puis amplifiés avec les amorces constFIS-1F et constFIS-2F. Ce produit PCR est sous-cloné dans le vecteur PCR4 suivant les recommandations du fabricant (Invitrogen) et vérifié par séquençage.

Les difficultés majeures rencontrées se sont situées dans la détermination *in silico* de la séquence codante complète ASAP et de sa reconstruction *in vitro*. En particulier, le choix des amorces et des différentes PCR de la région 3' ont été délicats en raison de la richesse de la séquence en polyA.

EXEMPLE 2 : Analyse bio-informatique

La Figure 1 représente la localisation chromosomique et la structure du gène *asap* humain.

L'organisation complète du gène *asap* et sa localisation chromosomique ont été obtenues en comparant la séquence de l'ADNc obtenu à l'exemple 1, à la séquence du génome humain en utilisant les programmes du Wellcome Trust Sanger Institute (<http://www.ensembl.org/genome/central/> et plus précisément le programme de recherche BLAST (<http://genome.cse.ucsc.edu/>).

Le gène humain *asap* est constitué de 29750 nucléotides comprenant 14 exons dont 13 seulement sont traduits, le premier exon n'étant pas traduit. La taille des exons s'échelonne de 71 à 321 paires de bases. La séquence du gène est contenue dans le contig AC097467 (longueur 178204 paires de bases) entre les bases 115117 et 143828 (version v.7.29a3 NCBI/Ensembl du 12 juillet 2002, <http://www.ensembl.org>), et est par ailleurs localisée sur le chromosome 4q32.1 entre les marqueurs anonymes D4S1053 et D4S571 (région 161,25 Mégabases (Mb) à 161,28 Mb). La séquence du gène est physiquement contenue dans le clone BAC RP11-27G13.

Deux acides nucléiques correspondants à des fragments du polynucléotide isolé par les Inventeurs sont répertoriés dans la base de données GenBank sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812, ainsi que les EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289,

BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, 5 BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952. Ces séquences, obtenues dans le cadre d'un programme de séquençage en masse de banques d'ADN complémentaires humains, sont incomplètes et 10 n'ont jamais été ni reconnues ni caractérisées.

La séquence protéique a été comparée aux séquences des banques de données en utilisant les programmes PSI-BLAST et PHI-BLAST du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sitemap/>). Des motifs protéiques consensus ont été recherchés en utilisant les programmes DART du NCBI et 15 SMART d'ExPASy-Tools (<http://www.expasy.ch/tools/#similarw>), dont les paramètres permettent de détecter des motifs de faible homologie. La protéine ASAP présente une identité de séquence de 23% sur le tiers C-terminal avec une protéine associée aux microtubules (MAP 1A pour Microtubule-Associated-Protein 1A). Par ailleurs la recherche de motifs 20 conservés (DART on SMART) révèle des domaines de type caldesmon (Gusev, N.B., Biochemistry, 10 1112-1121, 2000) et ERM (Ezrin/radixin/moesin) (Louvét-Vallet, S., Biol. Cell, 274 : 305-316, 2000), qui sont des protéines également considérées comme des MAPs, avec des identités d'environ 20%. Elle présente également un domaine BRCT (Breast 25 cancer carboxy-terminal domain ; Bork, P., et coll., FASEB J., 11, 68-76 (1997)) entre les positions 65 et 303.

La protéine ASAP présente des domaines coiled-coil essentiellement regroupés dans sa partie C-terminale entre les acides aminés 297 et 327 d'une part et 477 et 628 d'autre part, indiquant soit que la protéine 30 s'oligomériser, soit qu'elle interagit avec d'autres protéines.

L'analyse informatique de la protéine à l'aide des programmes accessibles dans le site internet (<http://npsa-bil.ibcp.fr/cgi->

bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_secons.html), révèle l'absence de feuillet β et une très grande richesse en hélices α , en particulier pour la région comprise entre les acides aminés 420-620, presque exclusivement formées d'hélices α .

- 5 Ces éléments permettent de penser que la protéine ASAP est une nouvelle MAP.

EXEMPLE 3 : Expression tissulaire

a) Analyse par Northern blot

Préparation des sondes radioactives :

- 10 Les ADN à radiomarquer sont isolés sur gel à bas point de fusion (LMP) selon la technique décrite dans Rouquier, S. et al., (Genomics, 17, 330-340, (1993)). Environ 100 ng d'ADN ainsi isolé, sont marqués par amorçage aléatoire (fragment de Klenow, Proméga) en présence de [$\alpha^{32}\text{P}$ dCTP] (Amersham) selon la technique décrite dans Feinberg, A.P. & Vogelstein, B., (Anal. Biochem., 132, 6-13, (1983)). Ces sondes sont purifiées sur des colonnes de Sephadex G-50 selon la technique décrite dans Sambrook J & Russell DW. (2000, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Les hybridations s'effectuent durant la nuit en présence de $2 \cdot 10^6$ Cpm/ml de sonde radioactive dénaturée.

a.1) Hybridation

- 20 Deux membranes Northern Blot de la société Clontech, (Human MTN Blot at Human MTN Blot II, Réf. 7760-1 et 7759-1) comportant des ARNm humains de différents tissus ont été hybridées avec l'ADNc hASAP complet marqué comme décrit ci-dessus. La membrane est hybridée en présence de formamide à 42°C, en suivant le protocole Clontech. Un contrôle d'hybridation de la membrane est réalisé avec une sonde actine. La membrane est rincée 2 fois à haute stringence en 0,1X SSC/0,1% SDS à la température de 42°C, pendant 15 minutes. Les membranes sont alors analysées par autoradiographie ou au Phosphorimager.

- 30 Les tissus testés sont : la rate, le thymus, la prostate, le testicule, l'ovaire, l'intestin grêle, le colon, les leucocytes sanguins, le cœur, le

cerveau, le placenta, le poumon, le foie, le muscle squelettique, le rein et le pancréas.

a.2) Résultats

La Figure 2 illustre ces résultats.

5 Deux signaux sont détectés :

- un signal dans le testicule à environ 2,6 kb, ce qui correspond à la taille de l'ARNm ;

- un signal dans le cerveau mais à un haut poids moléculaire (9 kb) qui correspond soit à un pré-messager, soit à une isoforme de haut poids

10 moléculaire

b) Analyse par RT-PCR

Cette analyse a été effectuée sur des ARNs totaux de différents tissus de souris, à savoir le cerveau, le cœur, le colon, le foie, l'intestin grêle, le muscle squelettique, le pancréas, le poumon, le rein, la rate et le

15 testicule.

b.1) Obtention de l'ADNc orthologue de souris

Les ARNs totaux de cellules de différents tissus de souris sont extraits avec le "mammalian total RNA kit" de la société Sigma. Les ARN sont rétro-transcrits avec le kit Superscript II de la société Invitrogen selon les

20 conditions prescrites par le fournisseur et en utilisant des amorces oligodT. Les produits obtenus sont vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. 1 µl de chaque échantillon ainsi obtenu est à son tour amplifié par PCR (25 µl de milieu de réaction, 30 cycles (94°C pendant 15 secondes, 55°C pendant 30 secondes, 72°C pendant 30 secondes)) avec des amorces spécifiques du

25 gènes *asap* de souris (mFIS-1F, 5'-ACA ACG AAT AAC AGA GTG TCC-3' (SEQ ID NO: 35) et mFIS-2R, 5'-ACT CCT GAT AAA CAG CTG CC-3' (SEQ ID NO: 36).

Les produits amplifiés obtenus sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%, colorés au bromure d'éthidium et leur taille

30 comparée à un marqueur de taille déposé sur le gel en parallèle.

Après électrophorèse, les produits amplifiés obtenus sont transférés par capillarité sur membrane de nylon chargée, dans le tampon

NaCl 1,5M/NaOH 0,5M, selon la technique de Southern (transfert alcalin). La membrane est ensuite hybridée avec une sonde radiomarquée mASAP, (SEQ ID NO: 44), générée par amplification de la séquence contenue dans le clone de souris AW06131 sélectionné après comparaison de la séquence ASAP humaine dans les banques de données (GenBank) (http://expression.gnf.org/promoter/tissue/images/41739_s_at.png).

L'amplification a été réalisée par PCR (conditions telles que décrites ci-dessus dans lesquelles le volume de réaction est de 50 µl et le dCTP froid est à la concentration de 10 µM supplémenté avec 50 µCi d' α -P³²-dCTP à 3000Ci/mmmole), en utilisant les amorces mFIS-1F (SEQ ID NO: 35) et mFis-2R (SEQ ID NO: 36). Les hybridations sont réalisées à 65°C (dans du tampon 6X SSC/0,5% SDS/5X Denhardt). La membrane est rincée à forte stringence (0,1X SSC/0.1% SDS), puis analysée par autoradiographie ou au PhosphorImager.

b.2) Résultats

La Figure 3 illustre ces résultats.

On constate qu'on obtient un signal majoritaire dans le testicule et le cerveau, nettement visible sur gel (Figure 3A).

Après transfert du gel et hybridation avec une sonde interne, on constate que l'on détecte un signal très faible dans les autres tissus (Figure 3B).

Par conséquent l'ARNm codant pour la protéine mASAP est majoritairement exprimé dans le testicule et le cerveau. L'ADNc complet de souris, amplifié par RT-PCR à partir de l'ARN de testicule de souris, correspond à la séquence SEQ ID NO : 45 et la protéine correspondante (mASAP) à la séquence SEQ ID NO : 46.

EXEMPLE 4 : Localisation cellulaire

a) Sous-clonage de l'ADNc hASAP dans un vecteur d'expression eucaryote

L'ADNc hASAP obtenu à l'exemple 1 est inséré dans trois vecteurs d'expression :

1- dans pEAK10-EGFP en phase avec la Green Fluorescent Protein (GFP) fusionnée en C-terminal (vecteur 1) (pEAK10, vecteur de Edge

Biosystems (distribué par Q.BIOgene, Illkirch en France) dans lequel a été introduit la protéine EGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) suivant la référence Gaillard, I., et al., Eur. J. Neurosci., 15, 409-418, 2002) ;

2- dans pEYFP-C1 en phase avec la Yellow Fluorescent Protein (YFP) fusionnée du côté N-terminal (vecteur 2) (distribué par BD Biosciences Clontech)) ;

3- dans GLOMYC3-1 comportant un tag MYC du côté N-terminal (vecteur 3) , vecteur dérivé du vecteur pcDNA3.1 (Invitrogen), dans lequel ont été insérées une région 5' non-traduite (5' UTR) et un tag MYC aux sites *HindIII-BamHI*, et la région 3'UTR de la globine (fragment *SpeI-XbaI* dans le site *XbaI*).

L'ADNc hASAP est amplifié à partir de son vecteur de clonage initial (pCR4-TOPO) par PCR en utilisant la polymérase haute-fidélité pfu Turbo, à l'aide d'amorces amplifiant l'ADNc entre la méthionine de départ et le dernier acide aminé. Les produits amplifiés obtenus sont sous-clonés dans les 3 vecteurs.

- Clonage dans PEAK-GFP. Préparation de l'insert d'ADN par PCR [94°C 2 min ; (94°C 15 sec.; 58°C 30 sec.; 72°C 1min 30 sec.) 30 cycles ; 72°C 3 min.], à l'aide des amorces hFIS-Exp1F (5'-GCCACCATGTCTGATGAAGTTTTTAGCAC-3) (SEQ ID NO: 37) et hFIS-Exp1R (5'-GAAACACTTTTGCGAACACAGTTC-3') (SEQ ID NO: 38).

Le vecteur est coupé par *EcoRV* et déphosphorylé : 10 ng de vecteur sont utilisés pour la ligation avec l'insert d'ADN. Le produit PCR est phosphorylé puis purifié sur high PURE PCR kit (Roche) : 100 ng d'insert sont utilisés pour la ligation [12h à 16°C dans 10 µl final (ligase Biolabs), suivant les conditions standards (Sambrook and Russell)].

- Clonage dans Glomyc : Préparation de l'insert d'ADN par PCR [94°C 2 min ; (94°C 15 sec.; 60°C 30 sec.; 72°C 1min 30 sec.) 30 cycles ; 72°C 3 min.], à l'aide des amorces : Glomyc-FIS1F : (5'-TAATGTCTGATGAAGTTTTTAGCACC-3') (SEQ ID NO: 39) et

Glomyc-FIS1R : (5'-TCAAAACACTTTTGC GAACACAGTTC-3') (SEQ ID NO: 40).

Conditions de clonage identiques à celles décrites pour le clonage dans PEAK-GFP.

- 5 - Clonage dans YFP : Préparation de l'insert d'ADN : mêmes conditions que pour Glomyc, à l'aide des amorces :
YFP-FIS1F (5'-AATGTCTGATGAAGTTTTTAGCACC-3') (SEQ ID NO: 41) et
Glomyc-FIS1R (SEQ ID NO: 40) (cf ci-dessus).

10 Conditions de clonage identiques à celles décrites pour le
clonage dans PEAK-GFP, le vecteur ayant préalablement été coupé par
*Sma*1.

Les recombinants sont analysés par PCR en utilisant une
amorce du vecteur et une amorce interne.

15 PEAK-GFP : annealing à 58°C, extension 45 sec. à 72°C. et conditions
standards pour le reste. Amorces : constFIS-2F (SEQ ID NO: 33) et GFP-1R
(5'-TCAGCTTGCCGTAGGTGGC-3') (SEQ ID NO: 42).

YFP : annealing 55°C pendant 1 min. ; Amorces : YFP-2F (5'-
ATGGTCCTGCTGGAGTTCG-3') (SEQ ID NO: 43) et hFIS-Exp1R (SEQ ID
NO: 38) .

20 Glomyc : annealing 44°C, extension 45 sec. à 72°C. Amorces : constFIS-2F
(SEQ ID NO: 33) et SP6. Les recombinants sont séquencés par séquençage
automatique à façon à partir des produits PCR (Genome Express, Meylan).

b) Sous-clonage de l'ADNc hASAP dans un vecteur d'expression procaryote

25 En utilisant une stratégie similaire à celle utilisée au para-
graphe a) ci-dessus, l'ADNc hASAP a été cloné dans le vecteur pGEX-4T2
(AMERSHAM), de façon à produire une protéine de fusion avec la GST,
purifiable selon les protocoles standards.

c) Sous-clonage de l'ADNc mASAP dans un vecteur d'expression procaryote
ou eucaryote

30 En utilisant une stratégie similaire à celle utilisée au para-
graphe a) ci-dessus, l'ADNc mASAP a été cloné dans les vecteurs suivants :

- pGEX-4T2, (AMERSHAM), de façon à produire une protéine de fusion avec la GST, purifiable selon les protocoles standards.

- pEYFP-C1 de façon à produire une protéine de fusion (fusion N-terminale) avec la Yellow Fluorescent Protein (YFP) détectable par immunofluorescence directe.

d) Transfection, immunofluorescence et microscopie

d.1) matériels et méthodes

Les vecteurs obtenus sont transfectés selon la technique au phosphate de calcium ou de façon plus routinière en utilisant le procédé jetPEI (GDSP10101, Qbiogene) suivant les recommandations du fabricant, dans les lignées cellulaires suivantes :

- PEAK (ref. 37937, Edge Biosystems (distribué par Q.BIOgene, Illkirch en France), uniquement pour les constructions ASAP humaines,

- HEK-293 (ATCC (American Tissue Culture Collection) référence CRL-1573 ; p53 -/- non synchronisable), pour les constructions ASAP humaines et murines,

- NIH3T3 non-transformées (constructions ASAP murines), et

- U-2 OS (ATCC HTB-96 ; p53 +/-, synchronisable)

Pour les vecteurs 1) et 2) (constructions ASAP humaines et murines), les localisations se font directement par détection de la fluorescence de la GFP ou de l'YFP à 24h, 48h et 72h après fixation des cellules au paraformaldéhyde et coloration des noyaux soit au propioiodure de propidium, soit au Hoechst 33286.

Pour le vecteur 3) la détection du tag MYC est réalisée à l'aide d'un anticorps primaire anti-MYC distribué par TEBU (9 E10, cat.#SC-40, Santa Cruz Biotechnology, CA) et d'un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris marqué au fluorochrome Alexa-594 (Molecular Probes, ref. A-11032, distribué en France par Interchim, Montluçon), après la fixation des cellules et leur perméabilisation au Triton X100 0,1%. Les lames sont analysées, et les images collectées sur un microscope Zeiss Axiophot.

d.2) Résultats : Localisation cellulaire et colocalisation de la protéine ASAP avec l'alpha-tubuline

- localisation cellulaire

La Figure 4 illustre la localisation cellulaire de la protéine hASAP surexprimée dans la lignée HEK-293 (IP = Iodure de propidium).

L'observation au microscope à fluorescence des lames correspondant aux différentes transfections par les vecteurs 1), 2) et 3) montrent les mêmes types de profil : la localisation des protéines hASAP et mASAP est cytoplasmique et son profil fibreux rappelle celui des filaments de tubuline.

Par ailleurs, il semble que les cellules transfectées présentent des défauts de division car les noyaux sont toujours plus gros que dans les cellules non transfectées (Figure 4A et 4B). De plus, certaines des cellules transfectées semblent plurinucléées (Figure 4B). Ceci suggère une division anormale des cellules transfectées.

Enfin, la mitose des cellules transfectées semble anormale, tant au niveau de l'organisation des chromosomes, que du profil de localisation des protéines hASAP et mASAP au niveau du fuseau mitotique. Le profil de localisation des protéines hASAP et mASAP, en étoile, est caractéristique de la nucléation des microtubules en aster autour du centrosome (Figures 4C et 4D).

Un profil similaire de localisation de la protéine ASAP est détecté dans la lignée U-2 OS (p53 +/-) surexprimant hASAP et dans la lignée NIH 3T3 non-transformée surexprimant mASAP ; une accumulation de cellules monopolaires en mitose est observée.

En outre, en synchronisant les cellules U-2 OS et en récupérant les extraits cellulaires à différents moments du cycle, il a été vérifié que la protéine ASAP était bien présente dans toutes les phases du cycle cellulaire (interphase, S, G2/M).

- colocalisation de la protéine ASAP avec l'alpha-tubuline

La Figure 5 illustre la co-localisation de la protéine ASAP humaine avec l'alpha-tubuline ; de même la protéine ASAP murine co-localise

avec l'alpha-tubuline.

La Figure 5 A illustre la localisation cellulaire de l'alpha-tubuline détectée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps anti-tubuline (Alexa-594, Molecular Probe).

5 La Figure 5 B illustre la localisation de la protéine ASAP marquée à la YFP (yellow fluorescent protein).

La Figure 5 C représente la superposition des 2 images démontrant la colocalisation des 2 protéines.

EXEMPLE 5 : Production d'anticorps polyclonaux anti-hASAP et mASAP

10 a) Production d'anticorps

Les constructions suivantes de la protéine ASAP ont été clonées dans le vecteur d'expression procaryote pGEX 4T-2 (AMERSHAM) comme décrit à l'exemple 4 :

- 15 - protéine ASAP humaine entière (SEQ ID NO : 1)
- protéine humaine délétée de sa partie C-terminale contenant le domaine MAP potentiel (résidus 1 à 421, SEQ ID NO : 47)
- protéine murine entière (SEQ ID NO : 46).

20 Les protéines ont été exprimées dans *E. coli* et purifiées selon les protocoles standards. Des lapins ont ensuite été immunisés avec les protéines ASAP purifiées selon un protocole standard, et les sérums immuns ont été récoltés.

b) Analyse de la réactivité des sérums polyclonaux vis-à-vis de la protéine ASAP endogène.

25 Les sérums polyclonaux monospécifiques dirigés contre la protéine hASAP entière ou délétée de sa partie C-terminale contenant le domaine MAP potentiel, ont été testées en Western-blot et en immunofluorescence, sur des cellules HEK-293 et U-2 OS, selon des protocoles standards.

30 En Western-blot, le sérum polyclonal monospécifique dirigé contre la protéine hASAP entière détecte une protéine d'un poids moléculaire apparent d'environ 110 kDa correspondant à la protéine ASAP endogène, aussi bien dans les cellules HEK-293 que les cellules U-2 OS. Dans ces conditions, un anticorps anti-FLAG, détecte une protéine de poids moléculaire

équivalent, dans des cellules contrôle HEK-293 ou U-2 OS, transfectées par un vecteur d'expression de la protéine hASAP fusionnée avec une étiquette FLAG.

5 En immunofluorescence, le sérum polyclonal monospécifique dirigé contre la protéine hASAP entière marque les microtubules des cellules HEK-293 en interphase, les asters des cellules en mitose et les microtubules du corps résiduel en fin de télophase.

Le sérum polyclonal monospécifique dirigé contre la protéine hASAP délétée de sa partie C-terminale contenant le domaine MAP potentiel
10 présente le même profil en immunofluorescence et détecte une protéine d'environ 110 kDa, en Western blot.

Le sérum polyclonal monospécifique dirigé contre la protéine mASAP est utilisé pour détecter quels sont les types cellulaires exprimant ASAP et à quel(s) stade(s) du cycle cellulaire elle est exprimée, par immuno-
15 fluorescence sur des coupes testiculaires de souris.

EXEMPLE 6 : Analyse fonctionnelle de la protéine hASAP à l'aide de mutants délétés de la partie N-terminale contenant le domaine BRCT ou de la région C-terminale contenant le domaine MAP potentiel.

Des fragments d'ADNc codant pour une protéine hASAP
20 délétée de la partie N-terminale contenant le domaine BRCT (Ndel1 : résidus 304 -647 (SEQ ID NO : 48) ; Ndel2 : résidus 411-647 (SEQ ID NO : 49) ; Ndel3 : résidus 478-647 (SEQ ID NO : 50)) ou de la partie C-terminale contenant le domaine MAP (Cdel1 : résidus 1 à 477 (SEQ ID NO : 51) ; Cdel2 : résidus 1 à 418 (SEQ ID NO : 52) ; Cdel3 : résidus 1 à 303 (SEQ ID
25 NO : 53)) ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces appropriées puis clonés dans les vecteurs d'expression pEAK10-EGFP (fusion C-terminale avec la GFP) et pEYFP-C1 (fusion N-terminale avec la YFP) selon un protocole similaire à celui décrit à l'exemple 4.

Les différentes constructions ont été transfectées dans les
30 lignées HEK-293 et U-2 OS puis la localisation cellulaire des différents mutants de la protéine hASAP a été analysée comme décrit à l'exemple 4.

On constate que pour les mêmes délétions, un profil similaire est obtenu avec la construction comportant la YFP en N-terminal ou la GFP en C-terminal.

5 Par comparaison avec la protéine hASAP entière, les 3 constructions délétées de la partie C-terminale ne colocalisent plus en inter-phase avec la tubuline et ne présentent plus un aspect fibreux ; ces résultats indiquent que la délétion intéresse un domaine MAP. En outre, aucune cellule monopolaire bloquée en mitose n'est observée dans les cellules surexprimant les mutants délétés de la partie C-terminale contenant le domaine MAP.

10 Par comparaison avec la protéine hASAP entière, les 3 constructions délétées de la partie N-terminale contenant le domaine BRCT, présentent une localisation nucléaire sous forme de foyers mais il reste dans le cytoplasme quelques fibres co-localisant avec la tubuline.

15 L'analyse fonctionnelle de la protéine hASAP est complétée par des expériences d'inactivation de l'expression du gène par des ARN interférents (ARNi).

REVENDICATIONS

1°) Protéine isolée, dénommée ASAP, caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par :

5 a) une protéine répondant à la séquence représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1, correspondant à la protéine ASAP humaine, et

b) une protéine présentant, sur la totalité de sa séquence, au moins 80% d'identité ou au moins 90% de similarité, de préférence au moins 90 % d'identité ou moins 95% de similarité, avec la protéine de séquence
10 SEQ ID NO: 1.

2°) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID NO: 46 correspondant à la protéine ASAP murine.

3°) Peptide, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un fragment
15 d'au moins 10 acides aminés consécutifs d'une protéine selon la revendication 1 ou la revendication 2.

4°) Peptide selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est sélectionné parmi les séquences représentées dans la liste de séquence en annexe sous les numéros SEQ ID NO: 2 à SEQ ID NO: 14 et SEQ ID NO: 47
20 à 53.

5°) Protéine variante de la séquence SEQ ID NO: 1 ou de la séquence SEQ ID NO: 46, caractérisée en ce qu'elle présente une mutation entraînant un dysfonctionnement de la protéine.

6°) Protéine ou peptide selon l'une quelconque des revendica-
25 tions 1, 3, 4 ou 5, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une protéine ou d'un peptide d'origine humaine.

7°) Polynucléotide isolé, répondant à une séquence sélectionnée dans le groupe constitué par :

- les séquences codant pour une protéine ou pour un
30 peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ;

- les séquences représentées sous les numéros SEQ ID NO: 15 et SEQ ID NO: 45 dans la liste de séquences en annexe, correspondant respectivement aux ADNc ASAP humain et murin,
- le fragment d'ADN génomique de 29800 nucléotides
5 répondant à la séquence représentée dans la liste des séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 16, correspondant au gène *asap* humain ;
- un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs de l'une quelconque des séquences précédentes, à l'exclusion des séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et des EST
10 répertoriés sous numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134,
15 AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007,
20 BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509,
25 BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835, AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans la base de données GenBank ;
- un fragment de l'un quelconque des séquences précédentes, sélectionné parmi les séquences représentées dans la liste des
30 séquences en annexe sous les numéros SEQ ID NO: 16 à SEQ ID NO: 30 ;

- une séquence présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 90 %, après alignement optimal avec l'une des séquences ou l'un des fragments précédents ;

5 - les séquences complémentaires des précédentes, sens ou anti-sens.

8°) Polynucléotide ou fragment selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide variant de la séquence SEQ ID NO: 15 ou 45.

9°) Polynucléotide ou fragment selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un polynucléotide porteur d'au moins une mutation conduisant à une modification de la séquence en acides aminés de la protéine correspondant à la séquence SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID N : 46.

10°) Utilisation d'un polynucléotide ou d'un fragment selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou de l'une des séquences répertoriées sous les numéros d'accès AK024730 et AK024812 et d'un des EST répertoriés sous les numéros d'accès BU198882, BM693711, AW372449, BM021380, BU928828, AL707573, AI885274, AI671785, AA805679, BU619959, BM021126, AL598336, AW976973, BU629726, AI433877, AV751613, BQ372751, AI827535, AI866257, AA843565, R96130, BU684090, BF958121, BQ351941, AW194906, BG203580, BF078132, AW486134, AL600279, AA025538, AL600264, BF170676, BU759494, BB025236, BF214179, AI283076, BE694273, AI266380, BM670854, AA968415, BU503982, BB700612, BE988355, BU058357, BB312934, AW061311, BM537962, BE988356, BB318982, BB311217, BB557152, BB185248, BB557128, BB698742, BB186736, AV345769, BB274293, BB632007, BB617958, AI391312, W18534, BB186581, BB311289, BB312835, AW347411, AA972439, BB263570, AU035125, BB277226, BB274224, BB268445, AW024037, AA025609, BB274174, R96089, BB272238, BB269037, BB385718, BE007324, BB325992, AJ275277, AI414381, BB125476, BB430961, BE232162, BQ121419, BQ121418, BG591509, BF457670, AL897593, AL897592, BM926692, BM538559, BI759567, AL601021, AL598780, AU222540, BG567619, AU166296, BF889835,

AU164011, AV656025, BF343454, AW262441, AW237952 dans la base de données GenBank ou de leurs fragments, comme sonde pour détecter, identifier ou doser des polynucléotides correspondants au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, particulièrement dans d'autres organismes.

11°) Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que la sonde est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 15, 45 ou SEQ ID NO: 17 à SEQ ID NO: 44.

12°) Amorce pour l'amplification des polynucléotides (ARN ou ADN génomique) correspondants au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, particulièrement dans d'autres organismes caractérisée en ce qu'elle est sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 31 à 43.

13°) Polynucléotide susceptible d'être obtenu par amplification à l'aide des amorces selon la revendication 12.

14°) Méthode de détermination du profil de transcription du gène correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13, ou d'une altération dudit profil, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié des ARN totaux à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ARN avec une sonde telle que définie aux revendications 10 ou 11 préalablement marquée dans des conditions classiques d'hybridation entre les ARN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

15°) Méthode selon la revendication 14, dans laquelle la deuxième étape est une étape de transcription inverse et/ou d'amplification des transcrits, réalisée à l'aide d'une paire d'amorces selon la revendication 12 et la troisième étape est une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés.

16°) Méthode selon l'une quelconque des revendications 14 ou 15, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'évaluation du

taux de transcription du gène par comparaison à un témoin préalablement choisi.

17°) Méthode de mise en évidence dans d'autres espèces du gène correspondant au polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13, ou de mise en évidence des variants alléliques dudit gène ou de mise en évidence d'une altération fonctionnelle de ce gène, dans un échantillon biologique, comprenant une première étape d'obtention par tout moyen approprié de l'ADN à partir de l'échantillon biologique, une deuxième étape de mise en contact desdits ADN avec une sonde telle que définie aux revendications 10 ou 11, préalablement marquée, dans des conditions classiques d'hybridation entre les ADN et la sonde et une troisième étape de révélation par tout moyen approprié des hybrides formés.

18°) Méthode selon la revendication 17, dans laquelle la deuxième étape est une étape d'amplification réalisée à l'aide d'amorces selon la revendications 12 et la troisième étape une étape de révélation par tout moyen approprié des acides nucléiques amplifiés formés.

19°) Méthode selon l'une quelconque des revendications 17 ou 18, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre une étape d'isolement et de séquençage des acides nucléiques mis en évidence.

20°) Trousse de réactifs pour la mise en œuvre des méthodes selon l'une quelconque des revendications 14 à 19 comprenant :

- au moins une sonde telle que définie aux revendications 10 ou 11 et/ou des amorces selon la revendication 12 ;
- les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction classique d'hybridation entre ladite sonde et/ou lesdites amorces et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ;
- les réactifs nécessaires à la mise en oeuvre d'une réaction d'amplification ;
- les réactifs nécessaires à la détection et/ou le dosage de l'hybride formé entre ladite sonde et l'acide nucléique de l'échantillon biologique ou des acides nucléiques amplifiés formés.

21°) Vecteur de clonage et/ou d'expression dans lequel est inséré un polynucléotide ou un fragment selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13.

5 22°) Cellules hôtes transformées, dans lesquelles au moins un polynucléotide ou un fragment selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 ou au moins un vecteur selon la revendication 21 a été introduit.

23°) Organismes transgéniques non-humains, dont tout ou partie des cellules contient au moins un polynucléotide ou d'un fragment selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 123 ou au moins un vecteur
10 selon la revendication 20, sous une forme libre ou intégrée.

24°) Organismes transgéniques non-humains selon la revendication 23 caractérisés en ce qu'ils sont porteurs de cellules contenant un polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 non fonctionnel ou porteur d'une mutation.

15 25°) Utilisation d'une cellule transformée selon la revendication 22 ou d'un organisme transgénique non-humain selon l'une quelconque des revendications 23 ou 24, pour la production d'une protéine ou d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

20 26°) Méthode de préparation d'une protéine ou d'un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'on cultive des cellules exprimant la protéine ou des cellules transformées selon la revendication 22 ou un organisme transgénique selon l'une quelconque des revendications 23 ou 24, dans des conditions permettant l'expression de ladite protéine, et que l'on purifie ladite protéine.

25 27°) Protéine, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par la méthode de préparation selon la revendication 26.

28°) Anticorps mono- ou polyclonal caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître spécifiquement une protéine ou un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27.

30 29°) Anticorps selon la revendication 28, caractérisé en ce qu'il reconnaît, parmi les MAPs, uniquement et spécifiquement la protéine ASAP de séquence SEQ ID NO: 1 ou SEQ ID NO: 46.

30°) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 pour la détection et/ou la purification d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27.

5 31°) Méthode de détection d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27, dans les cellules d'un échantillon biologique, comprenant

- une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire,
- 10 - une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 et
- une troisième étape de mise en évidence par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé.

15 32°) Utilisation d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 pour la détection et/ou la sélection de cellules présentant des perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou une induction des mitoses aberrantes et abortives liées à la surexpression de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27.

20 33°) Méthode d'évaluation *in vitro* de la capacité de prolifération ou d'agressivité de cellules cancéreuses comprenant

- une première étape de traitement convenable des cellules par tout moyen approprié permettant de rendre accessible le milieu intracellulaire,
- 25 - une seconde étape de mise en contact dudit milieu intracellulaire ainsi obtenu avec un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29,
- une troisième étape de mise en évidence et de mesure par tout moyen approprié du complexe protéine ASAP-anticorps formé et
- 30 - une quatrième étape d'évaluation du taux de transcription du gène par comparaison du taux de complexes protéine ASAP-anticorps formés à celui d'un échantillon biologique témoin préalablement choisi.

34°) Trousse permettant de mettre en oeuvre la méthode selon l'une quelconque des revendications 31 ou 33 comprenant :

- au moins un anticorps monoclonal ou polyclonal selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 ;

5 - les réactifs permettant la détection du complexe protéine ASAP-anticorps produit lors de la réaction immunologique.

35°) Méthode de criblage d'une substance capable d'interagir *in vitro*, directement ou indirectement, avec le polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 ou la protéine ou un peptide selon
10 l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27, caractérisée en ce que :

- dans une première étape on met en contact la substance à tester et le polynucléotide ou la protéine et

- dans une deuxième étape on détecte par tout moyen approprié le complexe formé entre ladite substance et le polynucléotide ou la
15 protéine.

36°) Méthode de criblage d'une substance capable de moduler l'activité de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27, caractérisée en ce que :

- dans une première étape on met en contact des cellules d'un échantillon biologique exprimant la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27, avec une substance à tester,

- dans une deuxième étape on mesure par tout moyen approprié de l'effet de ladite substance sur l'activité de ladite protéine, et

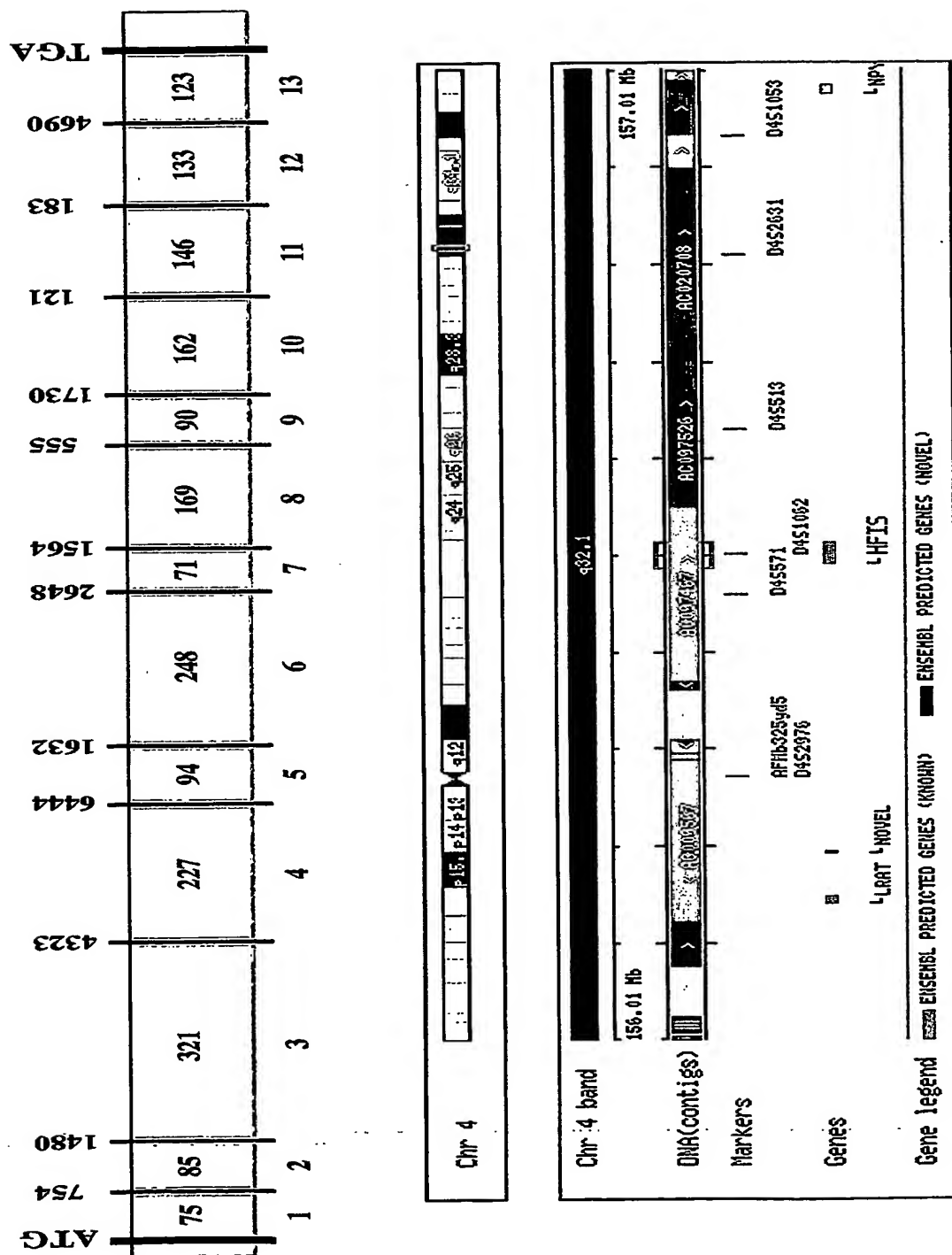
- dans une troisième étape on sélectionne des substances
25 capables de moduler ladite activité.

37°) Protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27 ou polynucléotide ou fragment selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 ou anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 ou vecteur selon la revendication 21 ou cellule transformée selon la
30 revendication 22, utilisé comme médicaments.

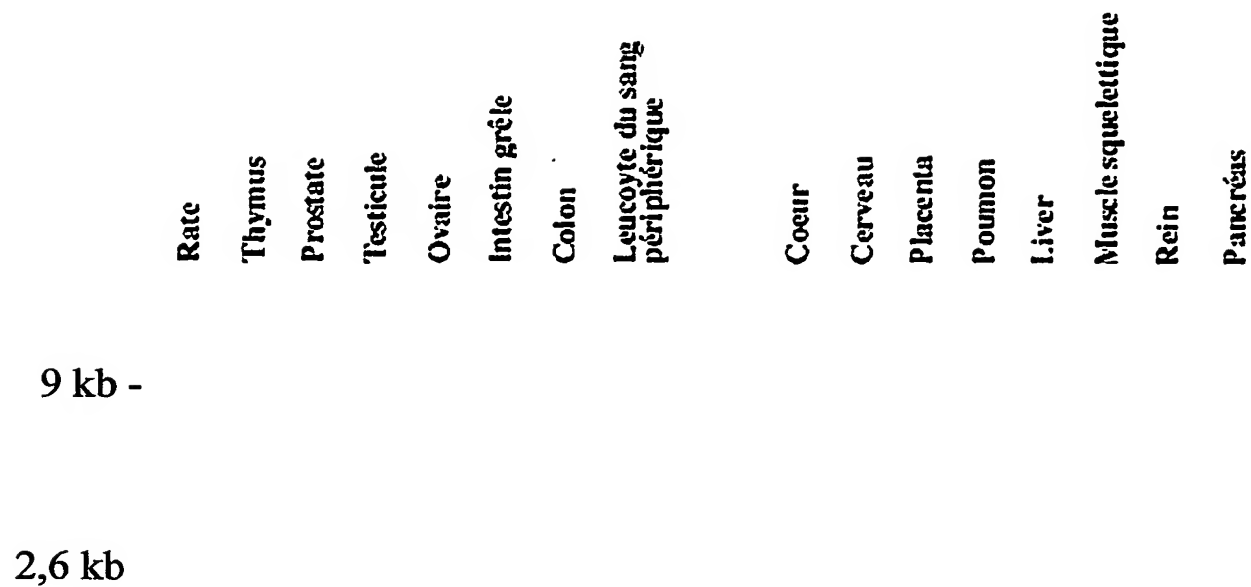
38°) Utilisation d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27 ou d'un polynucléotide ou d'un fragment selon

l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 ou d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 ou d'un vecteur selon la revendication 21 ou d'une cellule transformée selon la revendication 22, dans la préparation d'un médicament anti-mitotique.

- 5 39°) Utilisation d'un polynucléotide ou d'un fragment anti-sens selon l'une quelconque des revendications 7 à 9 ou 13 ou d'un anticorps selon l'une quelconque des revendications 28 ou 29 ou d'un vecteur contenant un oligonucléotide anti-sens selon la revendication 21 et capable d'inhiber l'expression du polynucléotide selon l'une quelconque des revendications 7 à
- 10 9 ou de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1, 2 ,5, 6 dans la préparation d'un médicament destiné au traitement des pathologies liées aux perturbations dans l'organisation du fuseau mitotique et/ou à une induction des mitoses aberrantes et abortives, liées à la surexpression de la protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 ou 27.



2/5

**Figure 2**

3/5

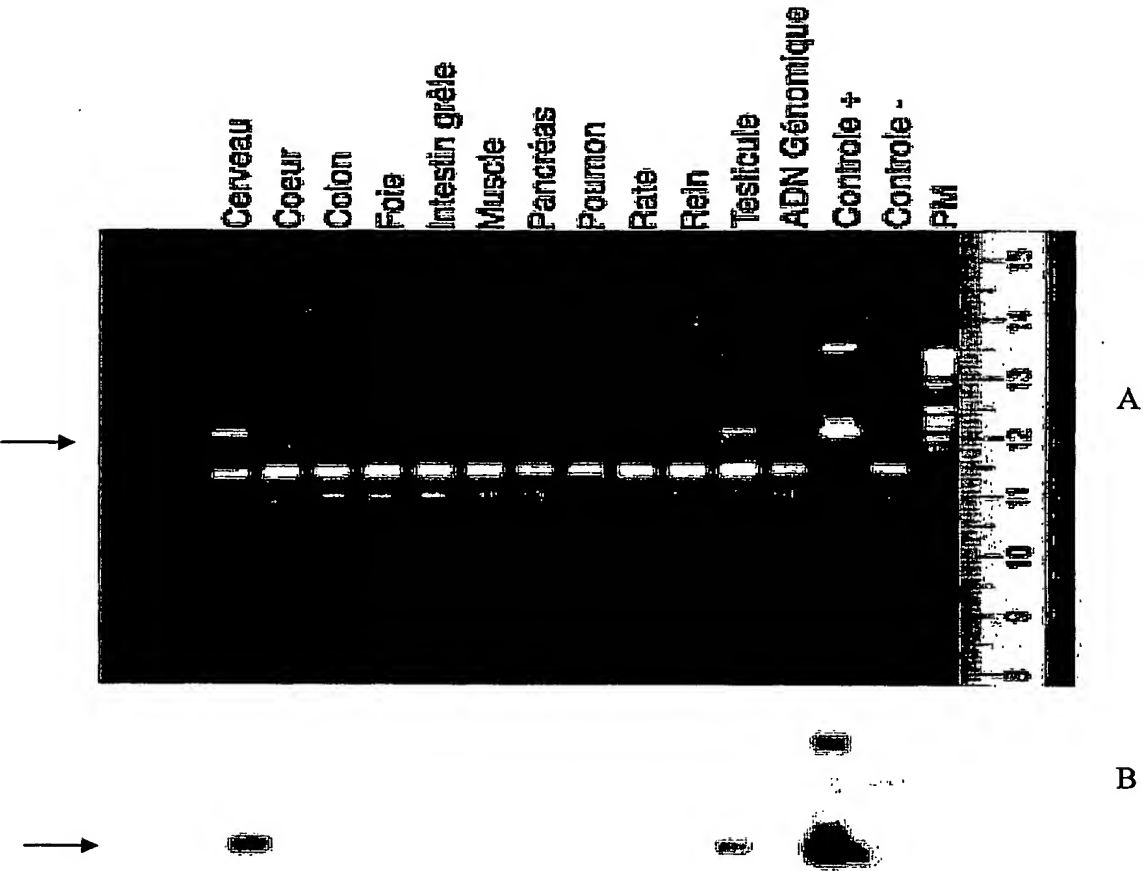


Figure 3

4/5

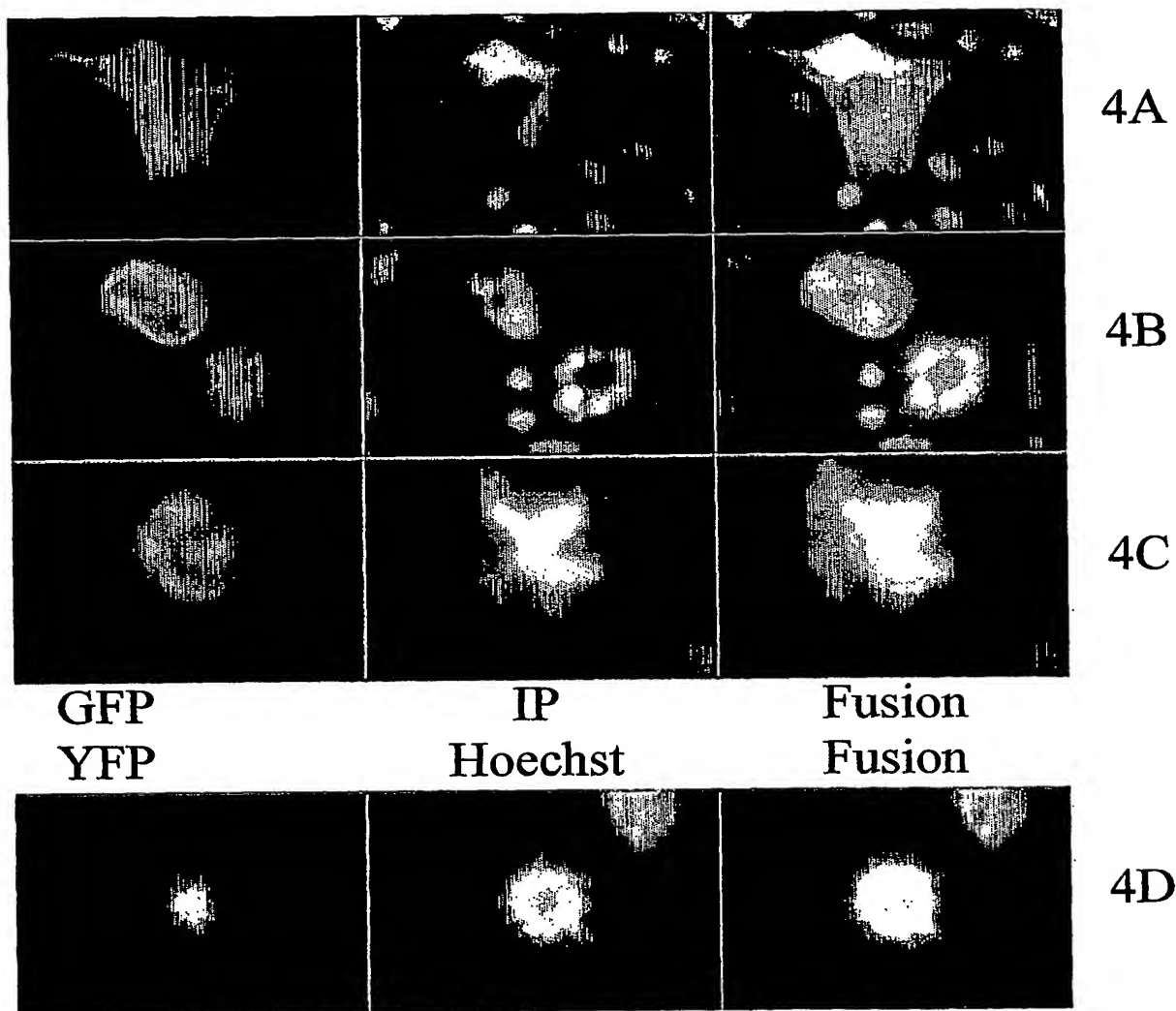
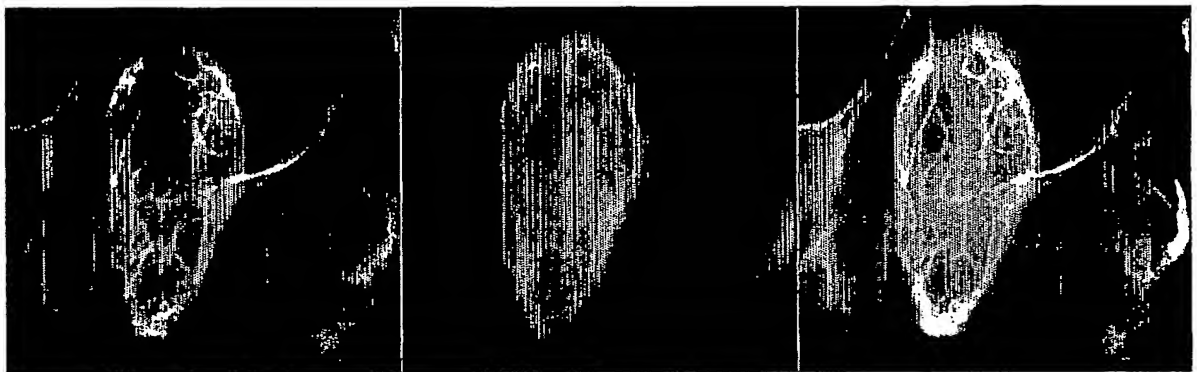


Figure 4

5/5



A

B

C

Figure 5

s644PCT88.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

GIORGI, Dominique

SAFFIN, Jean-Michel

ROUQUIER, Sylvie

<120> Nouvelle protéine associée aux centrosomes et ses applications

<130> s644PCT88

<160> 53

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 647

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro
1 5 10 15

Lys Val Thr Lys Arg Thr Thr Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile
20 25 30

Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe
35 40 45

Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala
50 55 60

Asp Glu Asn Ser Val Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp
65 70 75 80

Asp Glu Glu Lys Asn Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys
85 90 95

Ser Asn Gly Asn Ile Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn
100 105 110

s644PCT88.ST25

Glu Glu Glu Met Ala Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser
 115 120 125
 Phe Ser Glu Ser Gln Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile
 130 135 140
 Lys Met Lys Pro Lys Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser
 145 150 155 160
 Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro
 165 170 175
 Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp
 180 185 190
 Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His
 195 200 205
 Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala
 210 215 220
 Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu Asp Ser Cys Leu
 225 230 235 240
 Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ser Leu Lys Gln Ile Leu Gly Asp Ser Phe
 245 250 255
 Ser Pro Gly Ser Glu Gly Asn Ala Ser Gly Lys Asp Pro Asn Glu Glu
 260 265 270
 Ile Thr Glu Asn His Asn Ser Leu Lys Ser Asp Glu Asn Lys Glu Asn
 275 280 285
 Ser Phe Ser Ala Asp His Val Thr Thr Ala Val Glu Lys Ser Lys Glu
 290 295 300
 Ser Gln Val Thr Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu Lys Ala Lys Ala Glu
 305 310 315 320
 Leu Ile Met Asp Asp Asp Arg Thr Val Asp Pro Leu Leu Ser Lys Ser
 325 330 335
 Gln Ser Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ala Thr Ala Ser Ser Lys Lys Thr
 340 345 350
 Ile Glu Asp Arg Asn Ile Lys Asn Lys Lys Ser Thr Asn Asn Arg Ala
 355 360 365
 Ser Ser Ala Ser Ala Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Lys Ser
 370 375 380

s644PCT88.ST25

Ser Ser Lys Arg Arg Thr Pro Ser Thr Thr Thr Ser Ser His Tyr Leu
 385 390 395 400
 Gly Thr Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Pro Ser Gln Lys Gln Ser Ile
 405 410 415
 Glu Pro Asp Arg Ala Asp Asn Ile Arg Ala Ala Val Tyr Gln Glu Trp
 420 425 430
 Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His Arg Ile Lys Arg
 435 440 445
 Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln Lys Lys Ala Ala
 450 455 460
 Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp Lys Ala Met Lys
 465 470 475 480
 Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys Lys Arg Leu Glu Glu Lys
 485 490 495
 Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala Ala Arg Lys Gly Glu Ala
 500 505 510
 Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Met Glu Tyr Leu Lys
 515 520 525
 Glu Lys Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln Lys
 530 535 540
 Glu Glu Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Asn Leu Thr Ala Val
 545 550 555 560
 Glu Lys Trp Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe Phe Lys Gln Lys Lys Lys
 565 570 575
 Glu Lys Ile Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu Lys
 580 585 590
 Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu Tyr Glu Lys Trp Leu Glu
 595 600 605
 Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys Arg His
 610 615 620
 Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro Trp Ser Pro Pro Ser Arg
 625 630 635 640
 Thr Val Phe Ala Lys Val Phe
 645

s644PCT88.ST25

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro
 1 5 10 15

Lys Val Thr Lys Arg Thr Thr Phe Gln
 20 25

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser
 1 5 10 15

Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe Asp Ser Asp Glu Ile
 20 25

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala Asp Glu Asn Ser Val
 1 5 10 15

Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp Asp Glu Glu Lys Asn
 20 25 30

Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys Ser Asn Gly Asn Ile
 35 40 45

Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn Glu Glu Glu Met Ala
 50 55 60

s644PCT88.ST25

Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser Phe Ser Glu Ser Gln
 65 70 75 80

Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile Lys Met Lys Pro Lys
 85 90 95

Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser
 100 105

<210> 5

<211> 76

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro
 1 5 10 15

Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp
 20 25 30

Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His
 35 40 45

Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala
 50 55 60

Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu
 65 70 75

<210> 6

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Ser Cys Leu Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ser Leu Lys Gln Ile Leu
 1 5 10 15

Gly Asp Ser Phe Ser Pro Gly Ser Glu Gly Asn Ala Ser Gly Lys
 20 25 30

<210> 7

s644PCT88.ST25

<211> 83

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Asp Pro Asn Glu Glu Ile Thr Glu Asn His Asn Ser Leu Lys Ser Asp
 1 5 10 15

Glu Asn Lys Glu Asn Ser Phe Ser Ala Asp His Val Thr Thr Ala Val
 20 25 30

Glu Lys Ser Lys Glu Ser Gln Val Thr Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu
 35 40 45

Lys Ala Lys Ala Glu Leu Ile Met Asp Asp Asp Arg Thr Val Asp Pro
 50 55 60

Leu Leu Ser Lys Ser Gln Ser Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ala Thr Ala
 65 70 75 80

Ser Ser Lys

<210> 8

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Lys Thr Ile Glu Asp Arg Asn Ile Lys Asn Lys Lys Ser Thr Asn Asn
 1 5 10 15

Arg Ala Ser Ser Ala Ser Ala Arg
 20

<210> 9

<211> 54

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Lys Ser Ser Ser Lys Arg Arg Thr
 1 5 10 15

s644PCT88.ST25

Pro Ser Thr Thr Thr Ser Ser His Tyr Leu Gly Thr Leu Lys Val Leu
 20 25 30

Asp Gln Lys Pro Ser Gln Lys Gln Ser Ile Glu Pro Asp Arg Ala Asp
 35 40 45

Asn Ile Arg Ala Ala Val
 50

<210> 10

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Tyr Gln Glu Trp Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His
 1 5 10 15

Arg Ile Lys Arg Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln
 20 25 30

<210> 11

<211> 54

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Lys Lys Ala Ala Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp
 1 5 10 15

Lys Ala Met Lys Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys Lys Arg
 20 25 30

Leu Glu Glu Lys Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala Ala Arg
 35 40 45

Lys Gly Glu Ala Leu Gln
 50

<210> 12

<211> 49

<212> PRT

s644PCT88.ST25

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Met Glu Tyr Leu Lys Glu Lys
 1 5 10 15

Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln Lys Glu Glu
 20 25 30

Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Asn Leu Thr Ala Val Glu Lys
 35 40 45

Trp

<210> 13

<211> 43

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe Phe Lys Gln Lys Lys Lys Glu Lys Ile
 1 5 10 15

Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu Lys Lys Asp Lys
 20 25 30

Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu Tyr Glu Lys Trp
 35 40

<210> 14

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Leu Glu Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys
 1 5 10 15

Arg His Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro Trp Ser Pro Pro
 20 25 30

Ser Arg Thr Val Phe Ala Lys Val Phe
 35 40

s644PCT88.ST25

<210> 15

<211> 2575

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<400> 15
acttccttcg tctgggtggt tgccccagcg acacgttggg ccgaagagcg gtgttgggta 60
cccagagagac cggcggtg ggaagtcact tcctcccgaa gacgctgttt cctagcaacc 120
gccctccgcc tctgttatta gcccctctc ctcgctcggg ccaggaccgg ctctgcgggc 180
gccgccaggc ccagaccaag ctactatcag aagttgaatt ctaataatta gctattttat 240
aaaggtaacg agaaaaaata cactatgtct gatgaagttt ttagcaccac tttggcatat 300
acaaagagtc caaaagttac caaaagaact actttccagg atgagctaata aagagcaatt 360
acagctcgct cagccagaca aaggagttct gaatactcag atgactttga cagtgatgag 420
attgtttctt taggtgattt ttctgacact tcagcagatg aaaattcagt taataaaaaa 480
atgaatgact ttcatatatc agatgatgaa gaaaagaatc cttcaaaact attgtttttg 540
aaaaccaata aatcaaacgg taacataacc aaagatgagc cagtgtgtgc catcaaaaat 600
gaagaggaaa tggcacctga tgggtgtgaa gacattgttg taaaatcttt ctctgaatct 660
caaaataagg atgaggaatt tgaaaaagac aaaataaaaa tgaaacctaa acccagaatt 720
ctttcaatta aaagcacatc ttcagcagaa aacaacagcc ttgacacaga tgatcacttt 780
aaaccatcac cttggccaag gagtatgtta aaaaagaaaa gtcacatgga ggagaaggat 840
ggactagaag ataaagaaac tgccctcagt gaagaattgg agttacattc tgcaccttct 900
tcccttccaa cgccgaatgg catacaatta gaagctgaga aaaaagcatt ctctgaaaac 960
cttgatcctg aggattcatg cttacaagt ctagcatcat catcacttaa acaaattctt 1020
ggagattctt ttccaccagg atctgagggg aacgcactcg gaaaagatcc aatgaagaa 1080
atcactgaaa accataattc cttgaaatca gatgaaaata aagagaattc attttcagca 1140
gaccatgtga ctactgcagt tgagaaatcc aaggaaagtc aagtgactgc tgatgacctt 1200
gaagaagaaa aggcaaaagc ggaactgatt atggatgatg acagaacagt tgatccacta 1260
ctatctaaat ctgagagtat cttaatatct accagtgcaa cagcatcttc aaagaaaaca 1320
attgaagata gaaatataaa gaataaaaag tcaacaata atagagcatc cagtgcattt 1380
gccagattaa tgacctctga gtttttgaag aaatctagtt ctaaaaggag aactccatcg 1440
acaactacct cttctcacta tttagggact ttaaaagtct tggaccaaaa accttcacag 1500
aaacagagca tagaacctga tagagcagat aacataaggg cagctgttta tcaggagtgg 1560
ttagaaaaga aaaatgtata ttacatgaa atgcacagaa taaaaagaat tgaaagtgaa 1620
aacttaagga tccaaaatga acagaaaaaa gctgctaataa gagaagaagc attagcatca 1680

```

s644PCT88.ST25

```

tttgaggcct ggaaggctat gaaagaaaag gaagcaaaga aaatagctgc caaaaagagg 1740
cttgaagaaa aaaacaagaa gaaaactgaa gaagaaaatg ctgcaagaaa aggagaagca 1800
ctacaagctt ttgaaaaatg gaaagagaaa aagatggaat atcttaaaga gaaaaataga 1860
aaggagagag aatatgaaag agcaaagaaa cagaaagagg aggaaactgt tgccgagaaa 1920
aagaaagata atttaactgc tgttgagaaa tggaatgaaa aaaaggaagc ttttttcaag 1980
caaaagaaaa aagaaaaaat aaatgagaaa agaaaggaag aactgaaaag agctgagaaa 2040
aaagataaag ataaacaagc tattaatgaa tatgaaaaat ggctggaaaa taaggaaaaa 2100
caagaaagaa ttgaacgaaa acagaagaaa cgtcattcct ttcttgaaag tgaggcactt 2160
cctccgtgga gccctccaag cagaactgtg ttcgcaaaag tgttttgata attctagttc 2220
ttacattatt tggttattta tcggtttgcc aatattagcc atagatttaa accattcaat 2280
tatttatagt tagaggaata tattttaatt aaatgccaga cactcctgct gacaatgaaa 2340
gaaatacttt ggaatgtaat cagtgaagc atttttttga actgtagata aactgcctca 2400
aacaagacc taataatcag attgttttta ccattaagat acataagatt ttatcatgtc 2460
ctgataattc ttatggtgga gtgattcatg atctttttca ttaagctctg tatgttattt 2520
aagtatatatt aattccagta ataaaaagga aatcatctag gtaccataaa aaaaa 2575

```

<210> 16

<211> 29750

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<400> 16
tctgggtggg agttgggagg gtcctgtctc ctaggcaaca gcacatgcac acaagcgacc 60
aataatgagc ccctctcaa agaccagga aggtgatgtc acttccttcg tctgggtggt 120
tgccccagcg acacgttggg ccgaagagcg gtgttgggta cccgagagac ccggcggtgg 180
ggaagtcact tcctcccga gacgctgttt cctagcaacc gccctccgcc tctgttatta 240
gccctcctc ctcgctcggg ccaggaccgg ctctgcgggc gccgccaggc ccagaccaag 300
gtgagcagct cctaccgat gcttggtctt tgattctcag ggtcgcggag aactggccgc 360
gggctccgg ggccgggaac agaaagcggg acctgggggc catgggggat ccggacagag 420
accgcgcttg gacgtgcacg ggcctggcgt tcgctggtgc tcagcatacg gcgcggtgag 480
gagcggcgag caccgggacg tcaactggcc tggtagggaa cggaaccggg ggcgcacaac 540
gctatgggag gccctgccag gcctctgctc cgagtacggg aaaccgcgat ttaatgcgg 600
ctcatcgcga aagcttcgtc gttttgtctg gctctcttta acacttttgt gagaggaaaa 660
attggcttgc aatacatctc gctggctgtt tgcggggttag cattacgatc ttttctttg 720
aatagcgctg tatgcaaata tatagataca tttttttttt ggtgggtggtg ttcataattt 780

```

S644PCT88.ST25

| | |
|--|------|
| ttacgccgac gatccttttg atggcctttt aaataagacg tgacttattt tgaaggcaat | 840 |
| gttatacttt agaagagagg tgaaaaataa ggtgttctat ttttaattggc agcattttgt | 900 |
| cgtattaact tgtaatcatt tatttgcaga ctttttaagt agttgcaaaa ctatttttagg | 960 |
| ataacttcca tttgaatttt tttaaacaag cttgttatga gaatttgcta tttctttaca | 1020 |
| agaacctttt taagtgaaga tgtagcccaa tgttcatatc agatgctttt ctttgacctt | 1080 |
| tgtggggaga gtagaatcaa atgtaataaa ataaattctg aagcatgcga agtctgattt | 1140 |
| gttttgtata tttcagctac tatcagaagt tgaattctaa taattagcta ttttataaag | 1200 |
| gtaacgagaa aaaatacact atgtctgatg aagtttttag caccactttg gcatatacaa | 1260 |
| agagtccaaa agttaccaa agaactactt tccaggtaaa gtatttttat ttggaatcat | 1320 |
| ttcacagtgt aaacactgta ttagatgggt tgaaattgggt gattctagaa cagtcctata | 1380 |
| taaagcaggg gtaaattctta tattactttt gaggttttgc acatgatcat gtttgggctc | 1440 |
| catccagtat tacaaactcc cctatatggt ttttaagacta ccaaagtagc ctcaatacta | 1500 |
| gtttcctact aagttaaaag ttgaatcgca accttaaatt gccattttta tataaaaact | 1560 |
| tttttttctg ttgtaacata atgtttaagt ttttttttct gttgagtcac tgcaattttg | 1620 |
| aactcagcct ctaagtttgc aatattgatt gcatccattt ctgaaatatg ccgagacaaa | 1680 |
| agctcttaaa aataccaatt tctttcaaaa taccagtttt taataaatta taatctaaat | 1740 |
| tgagcccctt cttatttggt accctccagc tctaattata acctgcaatt aatttgttcc | 1800 |
| ataatgtgtg tctcctctag ttaaactgcg agctccatga ggaagggctc ttgtctgtga | 1860 |
| tgctctgcat tgagtatgag gcgtaaagtg ggtacatggc ataaagtgag cttgcaggaa | 1920 |
| atatttgtta gatgaatgaa acctaaagttt gaaagcagtc gttaatcaag cattgtttgt | 1980 |
| ttaaagaatt acttgtgaat atgatacctc catgtttgga tggaaattga tttcagtatc | 2040 |
| tcatttcagg atgagctaatt aagagcaatt acagctcgct cagccagaca aaggagttct | 2100 |
| gaatactcag atgactttga cagtgatgag attggtatgt gacagtatgg aaacgtgaac | 2160 |
| cacttttctt ctttttgctt ctttagtttt gtatttagcc agcccccaa ccacccatcc | 2220 |
| cctcaatcac gtatgttaaa ataataccta agcattcact aatttttagat tttcaacttt | 2280 |
| tttaattagta gaaagccact cttaattttc aggaagttgt atgattttct ttttttattg | 2340 |
| ttgttttggt ttctgaatgt gtatacgaaa atataaatta attgatggca ggtttgaggt | 2400 |
| aaaaggatgg ctgccagtgg taaaccacat tgaagaagac aggttcatct ttaagatcaa | 2460 |
| ccctaggagg tgctacagct agttagtaac tagtcccaca gaactaaact tcggtgcaca | 2520 |
| ttagaagtgc ttttataaag cttgctataa atcagatttt ttttggtgtg gataaggggt | 2580 |
| aaatttaaaa accacagact cttcgtgttt catatatcag tactattata atttggtttc | 2640 |
| tcttagctat gtaaacatat taacatttta gtttcaggta taagcataca gaattctaaa | 2700 |
| cttggtgttt ttgtttgttt gtttttgttt ttgagatgga gtctcgctca gttgctcaag | 2760 |
| ctggagtgca gtggtgcaat ctcggctcac tgcaacctcc acctcccagg ttcaagtgat | 2820 |

s644PCT88.ST25

| | |
|--|------|
| tctcctcctt cagcctcctg agtagctggg actacaggtg cccgccacca tgcccggcta | 2880 |
| atTTTTgtat ttttagtaga gatgggggtt caccacatcg gccaggctgg tctcgaactc | 2940 |
| ctgaccttgt gatccgcccc cctcagcctc ccaaagtgtg gggattatag gtgtgagcca | 3000 |
| ccgcacccgg cctgggtgtt tattctttaa aatttgggtga ataattgtaa ttgatttctg | 3060 |
| taaaaccagt aataaccaca gttaaatacac tgctgtatag ttaacttagc atttcttatg | 3120 |
| attcttagta aatctaatat tctgggtgtg atggaattgt agttccaaaa tttttatgga | 3180 |
| aaaaatataa ttagtaatta ctaattaaat tcttccattt acaaagtgtc ttgattttac | 3240 |
| atgaagaagt aatttgcaaa taaaagtgtt acagtccata atctaattta aatgctacat | 3300 |
| gactgattgt tagggacctt tggatggctt tttccagagc aaacagtgtt tggttgtttg | 3360 |
| gtaccctaca gacaacacaa taaatacatt ttgaataaat taatgaaatt ggaattttta | 3420 |
| tttcataaat gttaatgaga cgtgcctgag ttagctgtgt ttttagagct gcaagtctat | 3480 |
| ttataaaata catttgtgcc tattcattgt tagaattttg tttgtagctt ttaaggtaaa | 3540 |
| ctttgattaa gttaacgtaa ccttgacaat ttttaaaaat actgttgaaa acatttttct | 3600 |
| tttccatttt tcagtttctt taggtgattt ttctgacact tcagcagatg aaaattcagt | 3660 |
| taataaaaaa atgaatgact ttcataatc agatgatgaa gaaaagaatc cttcaaaact | 3720 |
| attgtttttg aaaaccaata aatcaaacgg taacataacc aaagatgagc cagtgtgtgc | 3780 |
| catcaaaaat gaagaggaaa tggcacctga tgggtgtgaa gacattgttg taaaatcttt | 3840 |
| ctctgaatct caaaataagg atgaggaatt tgaaaaagac aaaataaaaa tgaaacctaa | 3900 |
| accagaatt ctttcaatta aaagcacatc ttcaggtaat ttgttaggat tactgtaatt | 3960 |
| gcatttcttg gaagtttatt ttaagataat cagtcccaaa atttttatat ggtagctagt | 4020 |
| atatatttaa gaaaaaaga cagacttaac ttccatttta cagacctgtt gtattttgtc | 4080 |
| taacttcaat ttacagacc tgttgtattt tgtctaactt caattttaca gacctgttgt | 4140 |
| atTTTgtctt gcatctaggc tgttgccctga tagaaagcca aagcacaag ccaaagcacc | 4200 |
| tttagtcatc catagcatcc atagctgtgg atctccagac acctagacct gtgagcttca | 4260 |
| gttttgtttg taggtgtgga actggaatgg aatgctgtct aatccctctc acactccaaa | 4320 |
| gattagagtt acagcaatat tgagactaat ctttctaaca gtctttgcca taccaacatt | 4380 |
| gtgccagaaa atTTTcttga catttgtata tttgaaggat gagttatgtt attgctgctg | 4440 |
| ttgtttgttg aagcatccag gcactcctta agagaatctc catttgatct ctgtattgcc | 4500 |
| tatgaaaatc tactaagatt cagttttcca aaggaaagt cctgggtgtga tctgggatta | 4560 |
| cagttagttc tgcccacaat ttactgaat ttttaagcata aaggaacaaa gatagaatga | 4620 |
| aacggagacc aagtcctgtc acataccctg ggccaccatt catgaacttg tatatgcaag | 4680 |
| gttaaggatt ttttgttttt cattcttTgt atTTTataaa ggaattatta gttgatgtta | 4740 |
| accttcataa aaatctcctt gcatatcatc agtaaataca gtgctggtaa atatttcata | 4800 |
| ctttgcatat tagataccag tggtaacgtc agacaaaact ttatttcagg catgtattgg | 4860 |

s644PCT88.ST25

ggaactgctc ctttcttcct gacccacaa tctcattaac tttgaaatga gcaaaggatg 4920
 taagcagagc aaagaacact agaataatat ccaggacact gggggaaagg cctctgtata 4980
 ttatatatga cttcagcaaa taagttaagc ttcagtatcc tcatgatgag gaagctaaaa 5040
 ataaccctct ttctattcct gcaaaattgt gagagtttat tgaagtgcac ctcataaact 5100
 ataaaaaact acaaaaatgc aaacagatgc ataataaagc aattaacttg ttaaaatgta 5160
 ccttctaagt atagttagtg aaatcaatgc tggagagaag aggaacataa ttgaacttcg 5220
 ttattaagaa aatgcgagca tatatagcaa ctaaaaattt gtctgagaca ggtggatgta 5280
 tataattaga agtttatggt agataatcag gaaagcaata atccacctat ttcatacctt 5340
 aaaaaaaaaa aaaacctgtg gtgggttaca atgaataaga aaatactgta ttttaaccac 5400
 aaggtggcat caggatccta aatgctctac ttatatatgc aatgttatat tcagtacgtg 5460
 taatataaaa ataattacct aaataggtaa ttgtatacat tgattaccaaa aaaaagcgct 5520
 tttcttaaag tataggcatt ttttttctt tttgggaact tgacagtact tctggaagtg 5580
 gaatttttgt agaaaatata ttaagttgt cattctcagg ttcttcagggt tgaaaagtaa 5640
 aaattgaggc tagtgttcct aagataatat ctggcatata taataagtat ttaaatgaat 5700
 aaattaatat atgaatgatt tatctttgaa agaggggaata tggttcatga gtttatcctc 5760
 taaattcttt gacttttttt tttctgtac aggtttggaa ctcaatgttt ttaatgtggt 5820
 gagatattgc tgagtagcaa gtaatgcttt atgaaactat tagagcttga aggttttctc 5880
 tgtccttgct tgtcttttgt aaaaagtata ataaccagac tttatagtca ctactgaagt 5940
 gacagttgct ctataaagtg aaagtatttt tcacaggata tgtttttatt ttaatactaa 6000
 catgactgaa atcatgaact ttggagtcag gatgcttctc ctttaatctg agatctgcag 6060
 cctgctagag tttgtgactt tgggcatgag acctctttgt tctcatttta ttcattctta 6120
 aaaacgggat aatagttgcc tgcctctagg agtttgaggc aattaaatga gttcacatat 6180
 ttgaagtgct tagaatagta ctggcataaa tttagcactc tataaatggt ctgattattc 6240
 attttattat ttagcgtttg tttataaaca tgctcagcag gtataaagta tcagtcatgc 6300
 gggatgcgta agttctagag atctgctgta cattgtgcct atagttaaca gtactgtctt 6360
 ttgcactgaa tgtattaaga aggtagatct catgtttgtt cttaccacaa taataaaaaa 6420
 aattgactca acaccttctt tcaggcatta tataatattc tgcttaaaact gagggctcaa 6480
 agacatgcaa gcatttgta ggaggagaag caggaagtgg atattctagg cagggggatc 6540
 agcttaggta aaggtatggt agcaggaggg attggaggga ttgtggtatg tgtgcatgac 6600
 aactgttagc ccagcatttc agaaacacag atgacaaaat ggctgtagat aaggcagtga 6660
 aggacaaaac cataaaatcc gttttatggt gtttaaaggc agttaagctt ttattctgta 6720
 ggattggatc atggggagcc attgaataat tttgtagaaa ggagtgatgt gatctgattt 6780
 ggattttgta aatatcatgg aagcagtgat ctaggaaaga gtggataagg acccgacagc 6840
 agggatgtag aaagtggaat aaatgagata tttggcaatt agaattgata ggatatattg 6900

s644PCT88.ST25

| | |
|--|------|
| atactctgga tttaggggat aatagagga ggaatctaga gcccttggat ttgggggtga | 6960 |
| acatttggtt ggagtttagg atgtagctaa aattgtcagc tacttataat aataccaatt | 7020 |
| tggtatggtt gtggaatctt ctggcagaat ccataagccc attttttaggt aaatgggagg | 7080 |
| aagatgttaa ttagaccaat tttgaagttg agaaaaatgc atttgtagaa caatagaaac | 7140 |
| ataaatatgt atagcaggta aaatgcaggc aaaaaatata tacatggaaa gtcttcccat | 7200 |
| tgtttcgaat actggatgca aatcagcatt tgattcttga tttaaactta gaagtaatgg | 7260 |
| aaagagtga attttaataa atgctaaaga agttttatgg actcagaaca attaactcat | 7320 |
| aaaagattcc ttcctctaag gagagtttagc actcctatcc cttgagtgcc aacatcatca | 7380 |
| tctttgtcct tataatagca cttataatct tagtaatcta gtcttgtaat tttgtttaga | 7440 |
| aaaatcaacc tgtaaagtac ctggacaggc ccattgccgc tttgttgatt atgaggttta | 7500 |
| gtaacgtgta cagggtcttg tactcaaagg cttgatggat gagcctctc attttatagt | 7560 |
| ggtagaaact ggggcaagat tttgttttgt ttttttattt ttaacatttt ttttttaata | 7620 |
| ttataagagt tcacaatgtt gaagagttaa cttcttgtga ctggttactt tcaggatgac | 7680 |
| aactgtttct ttactttgtt ttttttttgt tgttgttgtt gtttggtttt tttttttttt | 7740 |
| ttagatggat ttttgcctct attaccagg ctggagtgca gtggtgtgat ctcgatctcg | 7800 |
| gctcactgca acctcagact cctgggttca agcaatcctc ctgcctcagt ctcctgagta | 7860 |
| gctgggatta caggcacgcg ctactaagcc cggctaattt ttttgtattt ttagtagaga | 7920 |
| cagggtttca ccgtgttagc caggctggtc tcgaactcct gacctcatga tctgcccacc | 7980 |
| tcggcctccc aacgtgctgg gattacaggc gtgagtcacc gctccaaca tgtcgggac | 8040 |
| acaggcgtga gccaccgcgt ccggcctgat tattaaccat catttatttg tgccttacta | 8100 |
| gagctctgta tagagaagag ttgtgggctt catctggact cttcaggaca gagaacaaag | 8160 |
| gggcataggc acaggagga agtatggtag caccagaga gatagataaa gccatggtca | 8220 |
| tttttttata cacacacttt aagcatttta tttttcagca gaaaacaaca gccttgacac | 8280 |
| agatgatcac tttaaaccat cacctcggcc aaggagtatg ttgaaaaaga aaagtcacat | 8340 |
| ggaggagaag gatggactag aagataaaga aactgccctc agtgaagaat tggagttaca | 8400 |
| ttctgcacct tcttcccttc caacgccgaa tggcatacaa ttagaagctg agaaaaaagc | 8460 |
| attctctgaa aaccttgatc ctgaggttag cactaccact aaactgttga attgtgttct | 8520 |
| tgaatttatg cttttttatc tgattatgaa aaagagaagg agagaatgaa tttgtgtgctg | 8580 |
| tgtgtgtgtg ttttacatac tttcttctgc aactgataag gaaataattt ttaaaaatac | 8640 |
| actgtattcc accgagtcta aaactgcatc aattgtaaga cgtagcatta ttttacatac | 8700 |
| cactaaggaa gaaggaaatg catccaatta aactataaca caccagtgat ttagagttt | 8760 |
| atccagtttt agagaaaagta aaatgtcaaa aagtgttgct tttctgaatc tatataatag | 8820 |
| tgtttatctt taataatttt ttaaatttat gtatctttga attatgtaat ttatggctaa | 8880 |
| gaacaatata gtcagtgtca ttttatttat ttgattttat tcactcaaca aatgtgtgtt | 8940 |

s644PCT88.ST25

gaatgttcat ggcactcttc tgtgttcttt gggttatgtt ccaatagcat taaatgtggc 9000
 ctttcagggt tccatcaggg aatttactat gcattgttat taaggagaa cacttcgttt 9060
 ttctctttgt atttcactat gagaagcaaa ctgtcccttc tgaacatttc agaagggaaa 9120
 agtacaggaa gaacatttct tccccataat ctgcttgggc agattagggg actgcatgcc 9180
 acctggccaa gcttctttct ttttctcatc gcttgtctgc agtggttggtg cttaaggatc 9240
 tgctctctgg gaggtgaggc agaaggtgct gagaggagct cttttgtgca atgactaaat 9300
 gggggaatcc ccctaattca gactggaagt attaggaagc acaataggct accaattcaa 9360
 atcttgttct gcagttgagc tttaccagta aagctgacaa tttgatatac gcctaactga 9420
 caccaccatg ctgtttctta atttgttctg aaaaccagaa gaagaaacc aagcaaatac 9480
 tttatattta agaaaattat ctgatccatt gaatattgtg ctagtcttct gtagctgctg 9540
 taacaaattg ccacaaactg gttaacttaa aacaacagaa atgtattctc ttagttctgg 9600
 aggtcagaag tccaagatca aggtgtttgc agggccattt tcctctgaag gcatcacgga 9660
 agaatccttc ctgacctt ccagcttctt tctagtgggt gccagcagtc catggcattc 9720
 cttggcttgt agctggcttg tagctgcatc attcccttct ctgccttcat cccatgtggc 9780
 cttcttccct gtgttttctc tgcattgtctg tgtctcttct ttctcttaaa aaaagacacc 9840
 aggcattgga tttaggggcc accctaattg agtgtgtcct catcttatct atttaaagct 9900
 gtaaacacct tatttcctaa gaaagtcgta ttttgagggt ctggatgaac atgaattttg 9960
 gggcattaat gttcgtatgt taaacctagc attcccggga taaactctgg ttagtcatgg 10020
 tgtgatattt tattgtggga tgtgatttgt taaaattgtg ttaaggtttg catctatatt 10080
 tatgaagtct attggctctg aatttttttc ttataatgtt accatcaggc ttgggtatca 10140
 aatgagttgg ggagtgtctt ttcttcattt tataaaagt ttggtatcatt attttcttaa 10200
 atgagaggat tcaccagtac aattatctgg gcctggaatt ttctgtgtgg agacatcttt 10260
 ggcattacat ttgatttttt aaataggat ttcagtactc acattttctg ttttgccagt 10320
 ttggtaattg tgtctatcaa gaagtttgtc catttcatct gatatgttga gtttataaac 10380
 agagtgttcc acgatagtcc ctcatctttt tgatgactag gattatcatg acatttcatt 10440
 tttatttcta acatatataa tttgtgtttt gtgtctttcg tgctaaatct tgataggcat 10500
 tgcttagttt tattaacgt ttttaagaac cacttcggct ttgtcatatg ttggtgcaaa 10560
 agtaattgca gttttggcca ttactttcaa tgacaaaaac cgcaatcatt ttgcaccaac 10620
 ctaataattt tctctattgt ttgtttaatt gattttcagt attatttcag tattattcag 10680
 tattatttct tttactttct tttttttttt ttgagacaga gtctcgttct atcgcccagg 10740
 ctggagtgca gtggtgcaat ccagctcac tgcaagctct gcctcccagg ttcactccat 10800
 tctcctgctt cagcctcccg agtagctggg actacaggca cccaccacca tgcttggtta 10860
 atttttgtat ttttagtaga gacgggggtt caccgcgtta gccaggatgg tctcgatctc 10920
 ctgacatcgt gatccacca cctcggcctc ccaaggtgtt gggattacag gcgtgagcca 10980

S644PCT88.ST25

cggcgcctgg cctcttttac tttcttttgg ttttaatttgc ttatcttttag atttgaaaat 11040
 tttctcattc atttttaaga ttttcgtgat ttctgctaaa cctgttgaaa ggtgtaaaact 11100
 ttcttctttg tactgcttta gtggccccga ttttttgatg ccttttattt ttattatcat 11160
 ttcttttaa atatatattt acttcccttg tgatctcctg ttttaaaaaat ttattttttt 11220
 agttgaaaaa taataattgt acatggggta catagtgatt tttcgataca tataatatat 11280
 agtgatcatt gtgatctctt ttttgaccag ttgggtattt tatgggtgatt tattttattt 11340
 tcaaatactt gtttttctc tagatatact tttgatgtta attataagtt aattttgttg 11400
 tagtctagag aatgtatctt acatgatttc aaatttttaa aaattattat tattatttct 11460
 aaatggccca gctttagtgt atcttgtgaa agtctcattt gcatctgcaa agtagatgtg 11520
 ttctccagggt gttgaatata atgttgata atttaagttt ggtcaacatg gttggtaata 11580
 tcattcagat cttctttatc cttactgatt tttcatccaa tttgtttacc cgttaccaac 11640
 ttaggggtat taaaatatcc agttatgttt gtgggtttgt ttatacttct ctttagttct 11700
 gtcagtattt tataactttg ttatcaggca catacacatt tattattatt atgttttgag 11760
 cattatgaaa cgtctctacc tctggtaata ttcctttcct tatcttatag attgttttgt 11820
 gtaatacttc agctttctta tgacaagtgt ttccatggta tatgctttct atcttttttc 11880
 tttcaacta attctgtctt ttcattgtaag tgaatctctt acaataagag tttggtgtca 11940
 cttttttatt aagtctgaca atctatgcct tttaatgtag tgtttagtcc atttatgaat 12000
 gttttgtcca tttaatgtaa atactgctat gatttgattt aggagcaatt tgttgctctt 12060
 tattttctat ttatctgttt tttaaaatta ttgtttttat tgttgtttct ctgttactcc 12120
 tttcttgctt ttttttgagg agataatcat gaatctttta gttttttatt attattgacc 12180
 ttttatctat atttgtttgc attgtatttc tcagagttga tcagtggatt acagaatata 12240
 tctgaaaatt atcacaatct atttagaatt gatattgtat tgtttcacat ttgatctaga 12300
 aaccttggaa taatatagtt ccatatactc cctcatccat tgtgctattg tcatatatta 12360
 tatctacata tcctataatc cccacaatag agttataact ttttcttaa gagccctttc 12420
 agttttttgt attagacttt taaaaaatta aagaaggcta gaataaatat atattatata 12480
 tctactgtat tatatattgt atatattata gataacattc tattgctaaa tatagataat 12540
 atatatttgt agacaatatc tatatatagg taatatatat tctattctta tatattatat 12600
 agatatataa catctatata atctatttat agatattaca tatctataaa tacatataca 12660
 atttctaggg atcttcattt cttcctgtag attcagatta ccattttgtg tcctgtcagt 12720
 cttacaaact tattttacat ttcttgtaat acaggtttac tagtgatgga tttttctcag 12780
 tctttgcttt tctaaaagta ttgtctcat ctttgttttc aaatgggtggg tgatgtgatt 12840
 gtattcttct tgtctaacag ttgccttctt ctacctccag ctctttatag gtttccattt 12900
 ttattggcct ctcttgtaat cattcatttc attgtcctct ctatataatg tgttgatttt 12960
 gtctgaatgc tgtcaggaat tttactcaag attgtggttt ttatcttttg attacagcaa 13020

s644PCT88.ST25

ttgactgca tggcgccctg gtctagcttt ctttatgttt attctgcttg acgtttgttg 13080
 agctttccaa acctataagc tgatactgtc tgtgaaatgg gaagattgtt atttcccacc 13140
 ctatTTTTca tcctctcctt ttggtactgt agttacacat gcattgaaat ttgtgctata 13200
 tctcactgat ctctgagatt ctgtttatat ttcttaaadc ttttttcctc tttgttttta 13260
 agattgaata acttgtatta cttagtcttc acgtttacag attgtggtcc ggagaatgta 13320
 tcttttatga tttcaaattg tattaatta tttgttttg ttttaatggc ccagcaaaag 13380
 ggtatgtcgt gagagttcca tttgcagttg caaagtatgt gtgttttcca ggtgaatttt 13440
 ttatttact tattgtggtg ttcaacttca gattttctat tggatttttt tctgtttttt 13500
 aatataaaat ccccatctt ttccagccatc atgcatatat tttcccaaa gtgcttgaac 13560
 atatttatat tagctatttt aaagtccttg tctgctaact ctaaaacgtg agtcatctct 13620
 gggttgggtc ctattgacca ttctctgttt ttttattttg ttttttaaata aagtgtcacc 13680
 attttctgtt tctttagtga cttttgattg aataccgggt gttctgaatg atattttgta 13740
 gagattctgt attcttttat gtcccttcaa acatattttc tagcaagtgg atatcatggc 13800
 tggacacaaa ttccaatcc tgtttctcct gcagtggata tcagctgaaa tttctgctta 13860
 attcttttca gtttctagct tctatgcttt tacaggatcc tctgaggctc cccttatgcc 13920
 acaaatagag gtggttaaagg tttttggtga atttcatatg cagattttgt ggtcactgtc 13980
 ctctgctatt ttccacatac ttattggctg atctgatggc cctagactca gtcccctgtt 14040
 cctcaagtc attccacaa ggctgtagcc ttctattact tgagctgcat agactggaga 14100
 atgccttctg gcaaaaagct actaatttgc agatctcctc aggtgaagct ttatctttca 14160
 gggtagactc cagtgtctca gcacttcttc cattttctca aatgttttct ctccattgct 14220
 tttgacatat aatttccttt gcaccataa aatactgcgg agaaagaaaa ttaaagtatt 14280
 tgtacaacaa agttgaactt cctacattgt aatatcatta ctttaggct agatgattct 14340
 atgaagaaat gtttacctta gatagacaaa tataattatt tcatatcaga tagaattttc 14400
 agaattttga ggaaaactca agtgcattgc atctatgtgc ttttctatc taaaatattt 14460
 ggaagtagcg gcttacttga ttttattaaa tgctttcatt tggataacta gtaatatgtg 14520
 cttggaacta aagtatttta cctgtcttct ttatgctttc cttcaaagga taattgtagg 14580
 aagagctatc aaaatcaaat cttggcctta aatatttata agaaatgtga ttattaagta 14640
 ataggagttt tgaaaattgg taaaaaataa atagagaggt ggtggtagtt aaagaacttg 14700
 aataactctt tcagtgacct cttttaatga ccaagacatc aaggcttgaa agtaaagcat 14760
 gcttacctcc attggcttgt cacactttgc gtttcagcaa caaatgccta aataatgcag - 14820...
 atttcagagt tatgcactat ttcaatttgt agttttaata atgctattgt tcccataaat 14880
 gtttaattatt aaacttatgt ggcaaatgta ttttttttg cgaaaacagg attcatgctt 14940
 aacaagtcta gcatcatcat cacttaaaca aattcttggg gattcttttt caccaggatc 15000
 tgaggggaaac gcatctggaa aagggtggtta tatctaataa ttatatctta tatgtgaact 15060

s644PCT88.ST25

ctgtactact tagactcctg tttgtaagag aaataatact ttgtatagtt ataagagaaa 15120
 tataatgtttt tatgtgtttg agttttaatc ctgactatgt agttaactaa ctgtgatttt 15180
 ggatgcagaa cttaatctct cagtgcctca atttccctaa gttatattat ttgtctcata 15240
 aggttattgt gaaaattaag tgatatagtg catttttagcc attagcctag ttaatagccc 15300
 aagtggagtg agcacttaag gtaaaactact gttatgtatg tgttgctgtg atattctgca 15360
 ggacaacata atagctaggt ggaattttta agtgagacta agctagattc caatacaggc 15420
 acaattacat aagcaaagta actaaccttt ctgaccctgt atgttgatct ttaaaatggg 15480
 taaaataaga gtaatttgcc ttatagggtg ttgtaagaat taaacatgta aagcatttac 15540
 agcaatacca tagtaagcac ttggtgtgat atgtgaattg ttaacataat ttcttttctt 15600
 agtgatacgt agcttaatga aacctaaaag acatagctat ttctaggtct gagatgtgta 15660
 atgaacattt tagtgcttac tatgtagtat catttttgtc attttacaga tgagaaaagc 15720
 tgaagtgcag tgacttaggg aaacataccc aaggtcagtg atggaaccat agttaaatct 15780
 tgagttccaa agttcttgtt cttttcactg aacagattaa cagctccaaa gaatccaata 15840
 gtgaattgag tgattttaag cccatgttac ctcaaaacaa attccaaaaa aatgggcata 15900
 atgaaaccaa cagaattaag acttttcaca gtaaagattc aggttttagct gcaagggtgga 15960
 cgttggtaga actgaaagtt ggtgatccca ttccaaaatg tggtaaaatc agaatagtag 16020
 aagcaattct ataaatgcaa aactgaatct tcttatgccag gagcttgagc ctgtttcttg 16080
 gagcactgag aggataagca ataggcttgt ctttattgcc ctttatggta tcagaggaag 16140
 tactacatct tggtagatg aaactcacta gagactgtgt aaaattgcat taattcttgg 16200
 ttctttctgc agctatacaa ttcaacaatt gtactactag taactgtagt agcctagaga 16260
 ggtgtgacac cttcttatgc agcgtgttgt tccagctaag aaactcaggc tttagagtta 16320
 aacaaatatt gtcactcac ttacttggtt tgtatatcaa caagctcttt tgacatgtcg 16380
 ttgttttagg gtagttattc cattctgttt attaatatgc tatttttcta agtactagat 16440
 ttgttaagtg cttcattagt taagcctaga ctattttttt ttgtaaatca ctttcgaaaa 16500
 gagtttatgc aagtttaata tgataacttt tcttcatatt ttgcaagaaa aaagagtta 16560
 tagatagtcc tcatttaaaa gaaagcaa atgaatcaagta tttaccttat taattcagaa 16620
 ggggggttta atgctattac tctgtctcaa aatagatcca aatgaagaaa tcactgaaaa 16680
 ccataattcc ttgaaatcag atgaaaataa agagaattca ttttcagcag accatgtgac 16740
 tactgcagtt gagaaatcca aggaaagtca agtgactgct gatgaccttg aagaagaaaa 16800
 ggcaaaagcg gaactgatta tggatgatga cagaacagtt gatccactac tatctaaatc 16860
 tcagagtatc ttaatatcta ccagtgcac agcatcttca aaggtatttg taaaaattca 16920
 tacttttcat actacagctt aaaacttgaa atagaacttt aagaaatttt atcttctgtg 16980
 ttatatactt ctgaattacc agtggaat ttatcttttg atagtgatat tgtattgtca 17040
 catggttctt acttaatcca ataaaattta actttaagga aagttttag tgaatataat 17100

s644PCT88.ST25

gaaacccagt gtttaaaaaat tatcagaggt gtgtgatcat aatatacttt taaatgtctc 17160
 agaaatgcat actcatagtg tatatatattc cataggtcct catattttaa aaatataact 17220
 gtctggaata atttctgaga ttttaaatga gagttatgtt tttggatatt gttttaaaac 17280
 gtgttaacaa ttttaacaaa aatcttaaag aaatgtttat caacagttaa tcaacatctg 17340
 tgcttcttta aaatagatgg ttatcatcag gaacattagt attattattc gtatttgatc 17400
 ctttgccttt atttcctaatt tttcaaaaata atgaactggg gccctggcaa cctccagagg 17460
 tgatgaagtt gctttgtttt ttcttttttc aattcatgta aatttaattg ttacaagtgc 17520
 ttttttgta catggatata ttgtgtagtg gtaaagtcag acttttagta taaactaaaa 17580
 tgtacattgt acccatgaag taatttctca tcccgcacct cctctcacc tttcctagtc 17640
 tccattatct attattccat accctatata catgtgtaca cattatttag ctctgacttg 17700
 taagtggaga catgtaccat ttgactttct gtttctgatt tatttcactt aaggtaatat 17760
 cctccagttc catccatgtt gtaaaagata ttatttcttt tctgtgtggc tgaatagtat 17820
 tcctgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt atacacattt tctttataca 17880
 atcatatgtt gatgtacact taggttgatt ccatactttt gctattgtga ctagtggtgt 17940
 gataaacatg agtgcaggta tcttttttat ataattgatt attttccttt tggcagatac 18000
 tcacagtggg gttgctggat tgagtggtag ttctatatat agttccttaa gaaatcccca 18060
 aactattttc cataaagatt gtactaattt acattcttac caagagtata caagcattcc 18120
 cttttctctg tgttctcacc aacatctgtt acttttttaa ctttttaata atagctaaat 18180
 attctgacta gtataatata tctcactgtg gttttaattt gtgtttctct gatgattagt 18240
 gatggtgaac attttttttc atgtttcttg gccacttgta tgtcttcttt tcaaaaagtc 18300
 tattcatgtt ttttgcctc tttttagtgg ggttatttgt tttttgtgt tgttgttgag 18360
 gggaaacatta ttattataac cttaagaaac agatatgtaa tatgtaggat tacttgtccc 18420
 tacattaaat tgtgcctgag tgctatactt taaaaattta tgggtgtagca ttttcagtct 18480
 ttgtttctcc tgaatttgtc attatctctt gtagctgcaa ttagctagca gctctgtgtg 18540
 tttattatca gcggaagaaa acagggctag ctgaaaattt gtgtttgagc aatactttta 18600
 taacataaaa tacaagcttt tcttaaaatt gatgaaggag gttcattaag ccatgttcca 18660
 ggtatatcat ccttagctaa tttcttttag aaaaaaacac tactgctaag ttagggatgt 18720
 gtttattatg tctgtgctct cactttacca ctagcaccca tcagtctgtg taaagtagaa 18780
 aagttgttcc ttaaaagaag aaaggatatt ccggagttaa tagacaggat tgtagaatgt 18840
 ctaatagagg caattctaaa ttagaacagg catttcatat gtaacaagta aggttgtaac 18900
 ttgtttcttt tgactggacc cttggcctca ttcttactct ctactgaatg accttttcta 18960
 aacagaaata taatcattct ccattaaagt cttttgttg gtttctcatc acaagaattc 19020
 catccagact cctcatcgtt gcctagtgat ctcacctggg tcttccctga ccacgtcttc 19080
 ctccgctttc cctgccattc actatgcttc agctccattc acctctttct gtttttcaga 19140

s644PCT88.ST25

gataacaggt tccgtccctt ctcaggcttt taccacttg ctgtttcttt ctttcataga 19200
cctttcgggtg ggccctttgc actcttagct ctgatgtcag cccctcagga cagccttccc 19260
tgaccaactt ctttaaagca gtcctcagc cccactctag tcattctctg tcaactgcaca 19320
ctattttatg tccttcatga gccatgtttg cttatatatt ttttttgggt catccgtctc 19380
tagaatttaa tttcttaag ggcattttat tcaactgattt gctcccaatt tctactgtgt 19440
ttgacacata gtagatgctt aaagaatagt gatttactgg cagtttggct tctaagccta 19500
aaaaggatag ttgtcatgaa taaatcatct ttggcatttt ctgtttaata gaaaacaatt 19560
gaagatagaa atataaagaa taaaaagtca acaataata gagcatccag tgcactgtcc 19620
aggtaataaa gttaccaata tttgtcattt atgggcttgc attctagcaa agctagtttt 19680
aatttaactt tcataaagta aatttcattt ggtgttactg ttttttcttt ttatttccat 19740
ttcataaaat gaaagtagtt aacttcatga taaaaccctt tggttgatga tattatttga 19800
aataaagtaa tttataaaaa gtaagtctat tactgattgt tttagtgcct ggaatgttta 19860
tgcaatacct ttgctctcca ggatcgctcct aggaatatatt ttcttctttc ttaatgtcag 19920
tgattagggg ttctttgtgc tccagactgc ttctggaata gagcttcttt ctctactttt 19980
tcctgagaca agcaatataa aatggtaata aagctgaagt ctagcaatga tacttattca 20040
ttatcaagta tcattgtcta acatgagaaa ttgtactgaa agccttcaga atctatgaac 20100
taagtagggt tattaaaaatg attatctgta tagcttcatt cacaccaatg ataatgaatg 20160
cctaactcat aagtgcataa caaaaacctt ctgaatcttt aaaattatcg ttagtcaaatt 20220
tatcattaat caaataaaac agagctagca agctttttct gtaaattggcc agttagtga 20280
tatttttaggc tttgtaggcg atacagtctg tattggaact actcatttct gctattttta 20340
caggaaagca gccacaggca aaacttaaca tgaatgatta cagctatgggt gcaataaact 20400
ttgtatatca aaaccaatgg ctggccaaat tttccacca atccctgata tagatagtac 20460
tattctttct aattttatat ttggaatgct tcatgtaaca aaatgatgaa agaaaatatt 20520
aaaagagtga ttataaccta ctgtattgtt ttttccatgt aacttgagaa gtggtccata 20580
tttcttaagt ttctaattac aaatatttaa aaagagcaat cattttaaag ctatataact 20640
taaagttata aaatttaaat tatgttgaag gggacatatt taagttatgt ccccttctac 20700
ataatttaat attctttgta tactaagact gtacatttta cctacatcat tttcaaagta 20760
attataattt gttaaattat aatgtagttt ccaatttttt ttttgagatg gagtctcact 20820
ctgttgctca ggctggagtt cagtggcatg atctctgctc actgcaacct ctgcctcctg 20880
ggctcaagct atcctccac ctgagcctcc agggtagcta tgactacagg catgtgccac 20940
cacgccagct aattttttgt atttttggtg gagacaggggt ttcacatgt tgcccaggct 21000
gggtcaacagc ccaacaggat gagctcaagt catccacca ctttggcctt ccaaagtgt 21060
gggattacag gtgtgagcca tcatgcctgg ccagttttca aatattatac gtgcatattc 21120
taacagatct ctcttctacc aaatgcaatt gtaatatatt gtcttgattc atttggatct 21180

s644PCT88.ST25

ttccagatta atgacctctg agtttttgaa gaaatctagt tctaaaagga gaactccatc 21240
 gacaactacc tcttctcact atttagggac tttaaaagtc ttggaccaa aaccttcaca 21300
 gaaacagagc atagaacctg atagagcaga taacataagg gcagctgttt atcaggtaaa 21360
 aaaggaaaat atttttaaga gaagaagaat gatcactttc ataagcctac actgtttata 21420
 aagaataaag taatcctgat agaaaatgat ggtttaatac ttaaatttat tgagaaagag 21480
 tttcctttta atacatgagt aatcatatatt tactaaatta tttgcttcca cactttgcat 21540
 aactgaccat agttgttttt aaagaaagaa tatgccattg caatttatag aaatacagca 21600
 caagccaaaa cattgtaaag tctatatatg ttttcatttt tttcttcttg aagtttatat 21660
 gaacaaaagg agttattatg aacaaaaagt tattaatttt tttctttcct gagatgttgt 21720
 taggcgtaca taggaaaaag attgtattaa tttattcaca attctaaaag tctttttttg 21780
 tcttttttag agtagaatag tatacttttag aaaattgtac atgtgaattt cagagaaaaat 21840
 gttaataata agaattctaa ttcacttaag aaatttttaa tattatatga cttttttctt 21900
 gttcttatag gagtggttag aaaagaaaaa tgtgtattta catgaaatgc acagaataaa 21960
 aagaattgaa agtgaaaact taaggatcca aaatgaacag gtattctgac atatagaagt 22020
 aaaaatgttt tggattttta tttcagtaa atatccctga atatataact tttctaaatc 22080
 agctttttta atggcaaaat aacttgata ttaaagaaat gatttccggt tttacttctg 22140
 ttttacttta tacatttttag tttgatataa ctgttttaca tgaaaacaga ttttaatttt 22200
 gtatatgtat aggatagctt tgttcctgct gattatgaag ttattattgt ttatgagcac 22260
 ctaattcact tttaaaagtt gatttcattt agaacttaac caagaaggcc aggtactgtg 22320
 gctcatgcct gtaatcccag cactttggga ggccaaggca gatgggattc cttgaggtct 22380
 ggagttcgac accagcctgg gcaatgtggt gaaaccccat ctctactaaa aatacaaaaa 22440
 ttagccaggg atggtggtgg gcacctgtaa tcccagctac tcaggaggct gaggtggcag 22500
 gatcacttga acccgggagg cggaggttgc agttagctga gatcgtgcca ctgtactcca 22560
 gcctaggtga cagagactct gtctcaaaaa aaaaaaaaaa ggcacgacaa gataaaggat 22620
 cattagacac tagttagcct tcaattttcc tcttttctct cttgaatttt ataagtatct 22680
 tcaagtccaa cccctacctg aactcttgat ctgtatcctt tccattgaa tggaggtgaa 22740
 cttttgttcc tgtctcttct gtactgagtc tcttcctcta actcctgctt gtaatacgct 22800
 cagttatttc ttatcttcta aagtcaaact tctggacaaa aactccagtg tgctgttcaa 22860
 tactaaaaat agatttagaa gaaaaatatt ttccaagggtg aactgcacga taatgcgtca 22920
 gtagtgaagg gagcagccct ccagggggcg tgcctgtcta tctgttaacc acgttcatag 22980
 cagtatgctg ctgtggctag tgccataccc cttctcattt gattttcgta gctctgtgag 23040
 gtagatagta ctttgacctc taaattatgt taccccaata ttaaggtttt atgtcattta 23100
 atattgaaca ataaagcaaa catagaatat tatgggatta gattgaagga agtaaaataa 23160
 taacataact tgctatacag tctccaacct atttttcagt cgagcacata ctttcaacat 23220

s644PCT88.ST25

ttggaataca tttgtgcagt aagaacttta tgttttgata ctattcaaaa ttaagattta 23280
 aacccaaaat ctgcatctta ctgcatggct tggccaattt gccttactct aacttacttt 23340
 ataagcccat aactttactg attttttttt caaatatttt attatgaaaa ttttactata 23400
 ccacttagcc tattacagtt tatttttgata taatttgttt agtacacttt caaaaataat 23460
 agttgacatc tttctcatta ataggtcaat atgtgataaa tgtttttaga aaaggacgtt 23520
 ttaaaaccaa tgaataattc agataacatt ctttgtaaat tatctaagcc attctaaata 23580
 aattacctac tttgaaagt aatttctaag tataatgaat atcagaggac taaagataaa 23640
 tgtatatgtg tatattttata tctagccata tttgtgtcta tgtatatata catatatatg 23700
 tatatcactc tattattttt tccactgtag aaaaaagctg ctaaaagaga agaagcatta 23760
 gcatcatttg aggcctggaa ggctatgaaa gaaaaggaag caaagaaaat agctgccaaa 23820
 aagaggcttg aagaaaaaaa caagaagaaa actgaagaag aaaatgctgc aagaaaagga 23880
 gaagcactac aagtattcag aactttgcac atcttaatta ttttaaaaca tttgaaatcc 23940
 aaattaatga ttaaccatat ttttattttat tttcaaatat tcacagtaag aaaattattc 24000
 tgaacttttt caggcttttg aaaaatggaa agagaaaaag atggaatatc ttaaagagaa 24060
 aaatagaaag gagagagaat atgaaagagc aaagaaacag aaagaggagg aaactgttgc 24120
 cgagaaaaag aaagataatt taactgctgt tgagaaatgg taatccaaaa tcataaatat 24180
 tttgatatat tttaaattat agtaacactt caggatttta taaaattttat ttacttgaaa 24240
 tttagtaatg catttcaatt tcattactgt caaagatgta ctagggaatc tttattatgt 24300
 attttccttt aactctccag tgtttttatac tatgtcttat aggaatgaaa aaaaggaagc 24360
 ttttttcaag caaaaggaaa aagaaaaaat aaatgagaaa agaaaggaag aactgaaaag 24420
 agctgagaaa aaagataaag ataaacaagc tattaatgaa tatgaaaaat ggctggtagg 24480
 tattattttgt caatgcactt tcgtcttttt catgtacctt ttgtgtcttt tctgtcccta 24540
 attctaattc tatttgctcc agacctactg atcatttcta cctggaatct gctttgttga 24600
 attcaagctc tcctctgca tatagcatat tttctttgac ttagtcattt ctattaatgt 24660
 ttctactatt ccctcaaaca cccaggctga aaacttgta taatcttctt ccttacctgc 24720
 atccccacat ttaccattta ctattcatgc ccattcttcc tttgctgtga ttctcacatc 24780
 taacatagaa agaagacaag ttactattg agggactact gtggtggaac ttggtcatga 24840
 caaaaagtaa cactgaactt aatagtgaga aaattattcc atcttttatt ctcttttgat 24900
 gtttctgatg acctcaagga gaatctctta tttaggaatt tttaatgaaa gagagcaggt 24960
 ttgaggttta ggaggagcaa tagctagctg aaccagatat gtgtatatat ttgatttcac 25020
 tttacttatc tttataaaag ttactttttg ttgatgtcaa gcaaaatatt attttccatt 25080
 ttagaatatc aatataaata tgcattttgt ccatgtttat ataagtaata cattactatg 25140
 aataaatact ttacataagt aggtaacaca ttcatatgaa tagttaacat attcatatga 25200
 ttcagcaacc aaaattatag tattttttgca ctagaagtct atccagtcag gtttcctatc 25260

s644PCT88.ST25

aaactttaaa acaactcata ccaatcaact aaatcatcca gggtgttttt gatttgcatt 25320
 tctctgggta gaattgagct tgaatatctt ttcatttgta tacaggccat ttatctatta 25380
 ttttctctgt aaattgtcat ttcatagact ttgcacactt ttctattaga ttgttggttt 25440
 tttttcctta ctggtttcta gaatcttttg ttttgtactg gggaaattag cctatcattt 25500
 tttatatggg ttgcaaatac ttacccccac tatattgttg gtttcccggc tttccttata 25560
 gtatctcatg ccatgaagaa tttaaatttt aggtgtcaga tttctgtttt ttttttttgg 25620
 cttttgattt tcaagcatag ttgaaaagac ctacacaatt tgagattaaa cagaattatc 25680
 ttatttttct tctaacaact ttgtgacttt aatatcttaa tgttttaaca tttgttctgc 25740
 ttggaatttg ccctgataca tgggtgggaaa tatgatttca acttttagttt ttccaaatgt 25800
 atcctttata aagtagccca tttttacca ttgatttgag gtgctacttc tgttatatga 25860
 taccttctca tgttttcggg tctgtttctt aactttctgt tccattgggtc agtctcgtga 25920
 ttccagtgcc acacttccat tattaggctt gatatgtcta aatatctgct tggattcatc 25980
 tccctttata gttcttcttt cacagtcttt ctgaccagtc ttgtttattt attttttcca 26040
 taaacttaag aatcagcagt agttagaaag gtacatggga ccaaaatgag cgatttaaaag 26100
 ataggataaa aagataaaac aataataaac ttaagaaaca tgccagacca acataaagaa 26160
 aattgtagaa ctctcctgaa caacacaaat gaagacttga gaaaatggat cagaattgcc 26220
 catgcacaga aacacactta accttataat gatgttataa ggatgtcagc tctccctgaa 26280
 gtcatttaat gcaatcttaa caaaagccaa caggatttac tctgtgtgtt gagtttagta 26340
 ctgctatatg ctaattcgat gcagagaaat agtaataaaa taaggtaatc aaaattgggt 26400
 caattttgaa tgaaaaaggt agtgtttcat gatgatttcc ttaagttaat ctgttaaata 26460
 atgctatgtt ctaaaaaaaaa atttaaagtc cacttatatt aagaagatgt aactgactg 26520
 ctagtatcaa ttagggaaat taaatgtaaa catttgagtt ttccatttta attccatatc 26580
 ttcatgaaaa tggaatagaa tttctttaat aagtcacatt taggtatact gtttttaatt 26640
 atagcactta attacattgt cattcttctc agtcctctga agaacaagaa ttcctcaaag 26700
 accaaagaca aaataacatg tttgatattc agtaaaatgt ctgcaaatac agtacaccta 26760
 taaacacata aacatacatg ttacagatcg gttctccttc ttaccaaatt cttattgaaa 26820
 tttgtttgca gatagaatag aaaaattgcc cctgtatagg agtctaataga cttcagtttt 26880
 catggaaaac aacatctcaa gctttttata taaaactag tttgaacagt aagcatttgg 26940
 tgggtaattg ctttagggga aagttaatag ccaaagatca ggtaagacta aaatattttt 27000
 cttgccaatt accagattaa ttcattcata ccttttagtaa gaaaataagc aaaaagctca 27060
 gttttccaca aataaatgtc tgaaggactt ttaacaagg ttcttttaata tactatcaag 27120
 gtgactattg attcttttga actgatatta cagttaatat aattgtctat ttgctaccct 27180
 ggctttacag ctccctgcta gtaagatgaa gcatatttca agttactgcc ccctcatggt 27240
 aagtgaattt acaaaaagag atttattcag tcaatttctg tggacacagt ctggtcactg 27300

s644PCT88.ST25

cttttcttcc gcctagctag atggtctgtc tctaaaatat taaaatgatt gaagatgattc 27360
 taattacagc tttgcttttc tcaattaaaa ttctgaaagg aagtttcctc tttgccttat 27420
 tagaaatagc aagcaaacaac acatgcaagc attcttatga catggaatga ggatatgggt 27480
 gttacattg acaaaaaaca acaaacctc ccacttact ttgtttgtta catgtgaatg 27540
 gaaagcttgt cctgtattgc catattattc ttgtggcatt tatatatata ctgatgaaaa 27600
 gatgcataca tacctaatac ttttccataa tgcctttcct cccaagccat caacctgcag 27660
 aggcaggttt cactaagggt tttcctgtc cttgaggaat atgagaaaaa taccaagatg 27720
 aagaaaccac caaaccttat agtgtagca gagacataaa gggacacctg gtgcccctc 27780
 tccatttctt gtctcctgcc ttctgccaag ccttagtcac aatggatatt tttgtttcct 27840
 cccacagcac acattttttt tcccactctc agagccctca ccactactgt ttgcaagcaa 27900
 agctcttccc cgatatttat cagcagtggtc ttctcttctc catcatgtca cacttcaaag 27960
 ggactttccc tgagtccatt tttgttgaa agtaaatact cttttttatt ccttctcata 28020
 gttttaaac atgtttcaga gaaattcaca caatttgaa ttatctgttg tttattttct 28080
 ttgtttctgt ccattttgaa agttccctgg gggacaggga ccatatctgt gtgttgggat 28140
 tttaaaaaat tattttttatt tgcaaatgac acataaaaag tgcacatatt tatggaatac 28200
 agtgtgatgt ttccatctac attgtataca ttgtgtaaca atcagaaatg actcaciaag 28260
 gtaggcaaaa tgtttgatgc aaagatatca ttaatattta ttataggaaa gtacacaaat 28320
 tactaaaaat taaaggcaaa taccatacat ttaaatgggc caaataattg agcagaaaat 28380
 ttacaaaagg ctaaagaaat gtttgaaaat gtgctcaagt tcaataataa agaaacatga 28440
 ggcagaattt ttaactattt gtaaaaaatt tgaagtatct cactactgtca tgacatattg 28500
 aaactttgca cccagtaaac ttacttctga gaatttggtc tcacgaagtc accaccaact 28560
 tataacagtt actatatttg agttataatt ataggctctt ttttctattt tatacaattc 28620
 ttttttaagt ttttctctt taaagtttaa aaaattaagt gatattagta cttgcaaatt 28680
 gacaatgttt actaattttt ttcttgtttc cattttttgt ttgtttgttt ttttgagaca 28740
 gggctctact ctgttgccca ggctggagtg cagtggtgca atctcggctc actgcaacct 28800
 ccacctcca ggctcaagca atcctcccat ctacgcctcc taagtaggtg ggactatagg 28860
 catgcaccgc cacacctggc taatttttgt gtgttttgt agagatgatg tttcaccatg 28920
 tttcccaggc tggctctgaa ctcccaggct caaacaatcc acccacctta gtctcctaaa 28980
 gttctgggat tactggcatg agccaccatg cctggcccta cctgttattt ctttatgatc 29040
 tgttaaacta ggaagtgata tataaatatc ctataatgga ttattttgtt cttcagcaag 29100
 caacctgatt tgaaaataat aatcatatat gtacataaat ttatagtgtt ctattttctc 29160
 tttaggaaaa taaggaaaaa caagaaagaa ttgaacgaaa acagaagaaa cgtcattcct 29220
 ttcttgaaag tgaggcactt cctccgtgga gccctccaag cagaactgtg ttcgcaaaag 29280
 tgttttgata attctagtct ttacattatt tggttattta tcggtttgcc aatattagcc 29340

s644PCT88.ST25

atagatttaa aaccattcaa ttatttatag ttagaggaat atattttaat taaatgccag 29400
 acactcctgc tgacaatgaa agaaatactt tggaatgtaa tcagtgaaag catttttttg 29460
 aactgtagat aaactgcctc aaacaaagac ctaataatca gattgttttt accattaaga 29520
 tacataagat tttatcatgt cctgataatt cttatgggtg agtgattcat gatctttttc 29580
 attaagctct gtatgttatt taagtatatt taattccagt aataaaaagg aaatcatcta 29640
 ggtaccataa tgatagaaat tattcctttt gtggatgatt gtgaatctag attcaggttt 29700
 ttaaatgaag ggtcgcctggg aagtgcgcat atattattcc ttctgaaact 29750

<210> 17

<211> 200

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17
 atttccttcg tctgggtggt tgccccagcg acacgttggg ccgaagagcg gtgttgggta 60
 cccgagagac ccggcgggtg ggaagtcact tcctcccgaa gacgctgttt cctagcaacc 120
 gccctccgcc tctgttatta gcccctcctc ctcgctcggt ccaggaccgg ctctgcgggc 180
 gccgccaggc ccagaccaag 200

<210> 18

<211> 139

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18
 ctactatcag aagttgaatt ctaataatta gctattttat aaaggtaacg agaaaaaata 60
 cactatgtct gatgaagttt ttagcaccac tttggcatat acaaagagtc caaaagttac 120
 caaaagaact actttccag 139

<210> 19

<211> 85

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19
 gatgagctaa taagagcaat tacagctcgc tcagccagac aaaggagttc tgaataactca 60
 gatgactttg acagtgatga gattg 85

s644PCT88.ST25

<210> 20

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20
 tttcttttagg tgatttttct gacacttcag cagatgaaaa ttcagttaat aaaaaaatga 60
 atgactttca tatatcagat gatgaagaaa agaatccttc aaaactattg tttttgaaaa 120
 ccaataaatc aaacggtaac ataaccaaag atgagccagt gtgtgccatc aaaaatgaag 180
 aggaaatggc acctgatggg tgtgaagaca ttgttgtaaa atctttctct gaatctcaaa 240
 ataaggatga ggaatttgaa aaagacaaaa taaaaatgaa acctaaaccc agaattcttt 300
 caattaaaag cacatcttca g 321

<210> 21

<211> 227

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21
 cagaaaacaa cagccttgac acagatgatc actttaaacc atcacctcgg ccaaggagta 60
 tgttgaaaaa gaaaagtcac atggaggaga aggatggact agaagataaa gaaactgccc 120
 tcagtgaaga attggagtta cattctgcac cttcttcctt tccaacgccg aatggcatac 180
 aattagaagc tgagaaaaaa gcattctctg aaaaccttga tcctgag 227

<210> 22

<211> 94

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22
 gattcatgct taacaagtct agcatcatca tcacttaaac aaattcttgg agattctttt 60
 tcaccaggat ctgagggaaa cgcattctgga aaag 94

<210> 23

<211> 248

<212> DNA

s644PCT88.ST25

<213> Homo sapiens

<400> 23
 atccaaatga agaaatcact gaaaaccata attccttgaa atcagatgaa aataaagaga 60
 attcattttc agcagaccat gtgactactg cagttgagaa atccaaggaa agtcaagtga 120
 ctgctgatga ccttgaagaa gaaaaggcaa aagcggaaact gattatggat gatgacagaa 180
 cagttgatcc actactatct aaatctcaga gtatcttaat atctaccagt gcaacagcat 240
 cttcaaag 248

<210> 24

<211> 71

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24
 aaaacaattg aagatagaaa tataaagaat aaaaagtcaa caaataatag agcatccagt 60
 gcatctgcca g 71

<210> 25

<211> 169

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25
 attaatgacc tctgagtttt tgaagaaatc tagtttctaaa aggagaactc catcgacaac 60
 tacctcttct cactattttag ggacttttaa agtcttggac caaaaacctt cacagaaaca 120
 gagcatagaa cctgatagag cagataacat aagggcagct gtttatcag 169

<210> 26

<211> 90

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26
 gagtggttag aaaagaaaaa tgtgtattta catgaaatgc acagaataaa aagaattgaa 60
 agtgaaaact taaggatcca aaatgaacag 90

<210> 27

s644PCT88.ST25

<211> 160

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

aaaaaagctg ctaaaagaga agaagcatta gcatcatttg aggcctggaa ggctatgaaa 60

gaaaaggaag caaagaaaat agctgccaaa aagaggcttg aagaaaaaaa caagaagaaa 120

actgaagaag aaaatgctgc aagaaaagga gaagcactac 160

<210> 28

<211> 146

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

gcttttgaaa aatggaaaga gaaaaagatg gaatatctta aagagaaaaa tagaaaggag 60

agagaatatg aaagagcaaa gaaacagaaa gaggaggaaa ctgttgccga gaaaaagaaa 120

gataatttaa ctgctgttga gaaatg 146

<210> 29

<211> 133

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

gaatgaaaaa aaggaagctt ttttcaagca aaaggaaaaa gaaaaataa atgagaaaag 60

aaaggaagaa ctgaaaagag ctgagaaaaa agataaagat aaacaagcta ttaatgaata 120

tgaaaaatgg ctg 133

<210> 30

<211> 485

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

gaaaataagg aaaaacaaga aagaattgaa cgaaaacaga agaaacgtca ttcctttctt 60

gaaagtgagg cacttcctcc gtggagccct ccaagcagaa ctgtgttcgc aaaagtgttt 120

tgataattct agttcttaca ttatttggtt atttatcggg ttgccaatat tagccataga 180

s644PCT88.ST25

| | | | | | | |
|-------------|------------|-------------|------------|------------|------------|-----|
| ttttaaaccac | ttcaattatt | tatagttaga | ggaatatatt | ttaattaaat | gccagacact | 240 |
| cctgctgaca | atgaaagaaa | tactttggaa | tgtaatcagt | gaaagcattt | ttttgaactg | 300 |
| tagataaact | gcctcaaaca | aagacctaat | aatcagattg | tttttaccat | taagatacat | 360 |
| aagattttat | catgtcctga | taattcttat | ggtggagtga | ttcatgatct | ttttcattaa | 420 |
| gctctgtatg | ttatttaagt | atattttaatt | ccagtaataa | aaaggaaatc | atctaggtac | 480 |
| cataa | | | | | | 485 |

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 31

atgtctgatg aagtttttag cacc 24

<210> 32

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 32

aggcctcaaa tgatgctaata gc 22

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 33

atcatttgag gcctggaagg c 21

s644PCT88.ST25

<210> 34

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 34

aaacactttt gcgaacacag ttc

23

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 35

acaacgaata acagagtgtc c

21

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 36

actcctgata aacagctgcc

20

<210> 37

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

s644PCT88.ST25

<400> 37
gccaccatgt ctgatgaagt ttttagcac 29

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 38
gaaacacttt tgcgaacaca gtgc 24

<210> 39

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 39
taatgtctga tgaagttttt agcacc 26

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 40
tcaaaacact tttgcgaaca cagttc 26

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial sequence

s644PCT88.ST25

<220>

<223> Amorce

<400> 41

aatgtctgat gaagttttta gcacc

25

<210> 42

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 42

tcagcttgcc gtaggtggc

19

<210> 43

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Amorce

<400> 43

atggtcctgc tggagttcg

19

<210> 44

<211> 391

<212> DNA

<213> Murinae gen. sp.

<400> 44

| | |
|--|-----|
| aaagaagtga agacagaaac acgaagaata aaaagacaac gaataacaga gtgtccagtg | 60 |
| cctctggcag gctgatgacc tctgagtttt taaagagatc cgggccaca aaaagaagtc | 120 |
| catctgcagc tacctcctca cactatcttag ggagtttgaa agtcttggac cagaagcaac | 180 |
| cacggaagca gagcctagag ccagacaagg ctgatcacat aagggcagct gtttatcagg | 240 |
| agtggttaga aaagaaaaat gtgtattttac atgaaatgca cagaataaaa agaattgaaa | 300 |
| gcgaaaactt gaggatccaa aatgaacaga aaaaagctgc taagagagag gaagccctgg | 360 |
| catcatttga ggcctggaag gcaatgaaag a | 391 |

s644PCT88.ST25

<210> 45

<211> 2767

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (204)..(2147)

<223>

```

<400> 45
gttgggtacc caagagacca ggcggttgga agtcacttcc tcccggggac gctgttgccct 60
agcaaccgcc ttctgcctcc atcttttgcc ccgcctccag gttattccaa tacctggttt 120
cccagaccgc gagggccggg ccgggggcga cacctgtgct agagcatagc cgctgggttc 180
tcagcagaga aaaaggacac acc atg tcc gat gaa atc ttc agc aca act ttg 233
                        Met Ser Asp Glu Ile Phe Ser Thr Thr Leu
                        1 5 10

gcg tac acc aag agt cca aag gct acc aag aga act tcc ttt cag gat 281
Ala Tyr Thr Lys Ser Pro Lys Ala Thr Lys Arg Thr Ser Phe Gln Asp
                        15 20 25

gag ctg atc aga gcc att aca gcc cgg tca gcc agg cag aga agt tcc 329
Glu Leu Ile Arg Ala Ile Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser
                        30 35 40

gaa tac tcc gat gac ttt gac agt gac gag att gtt tct tta ggt gaa 377
Glu Tyr Ser Asp Asp Phe Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Glu
                        45 50 55

ttt tca gat acc tcg aca gat gaa agt cta gtt aga aaa aag atg aat 425
Phe Ser Asp Thr Ser Thr Asp Glu Ser Leu Val Arg Lys Lys Met Asn
                        60 65 70

gat ttt cat ata tcc gac gat gag gaa aaa aat tct cca aga ctg tct 473
Asp Phe His Ile Ser Asp Asp Glu Glu Lys Asn Ser Pro Arg Leu Ser
                        75 80 85 90

ttt ttg aaa acc aag aaa gta aac agg gca ata tcc aac gat gct ctg 521
Phe Leu Lys Thr Lys Lys Val Asn Arg Ala Ile Ser Asn Asp Ala Leu
                        95 100 105

gac tcc agc act ccg ggc agc gaa ggc tcg tca ccg gat gct caa gaa 569
Asp Ser Ser Thr Pro Gly Ser Glu Gly Ser Ser Pro Asp Ala Gln Glu
                        110 115 120

gat gtg act gga gat tcc ctc ccc aaa tct caa aat gat gat cga gaa 617
Asp Val Thr Gly Asp Ser Leu Pro Lys Ser Gln Asn Asp Asp Arg Glu
                        125 130 135

gtc ggc aga gag atc atc aca gtg aag cct aca ccc agg atg cac ccc 665
Val Gly Arg Glu Ile Ile Thr Val Lys Pro Thr Pro Arg Met His Pro
                        140 145 150

```

s644PCT88.ST25

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| gtc | aaa | aga | agc | acg | tcc | tcg | ggg | gaa | acc | agc | agc | ggc | ctt | gat | gca | 713 |
| Val | Lys | Arg | Ser | Thr | Ser | Ser | Gly | Glu | Thr | Ser | Ser | Gly | Leu | Asp | Ala | |
| 155 | | | | | 160 | | | | | 165 | | | | | 170 | |
| gat | ggc | cac | ttt | aag | cct | tca | ccc | cag | cca | agg | agc | atg | tta | aaa | aag | 761 |
| Asp | Gly | His | Phe | Lys | Pro | Ser | Pro | Gln | Pro | Arg | Ser | Met | Leu | Lys | Lys | |
| | | | | 175 | | | | | 180 | | | | | 185 | | |
| agc | agc | cac | act | gag | gag | gga | gtc | aga | cca | gga | ggt | gat | aaa | gaa | cat | 809 |
| Ser | Ser | His | Thr | Glu | Glu | Gly | Val | Arg | Pro | Gly | Val | Asp | Lys | Glu | His | |
| | | | 190 | | | | | 195 | | | | | 200 | | | |
| tcc | ata | agc | gaa | gcc | tct | gct | ccc | aca | cct | tcc | ctt | cca | agg | cag | aat | 857 |
| Ser | Ile | Ser | Glu | Ala | Ser | Ala | Pro | Thr | Pro | Ser | Leu | Pro | Arg | Gln | Asn | |
| | | 205 | | | | | 210 | | | | | 215 | | | | |
| ggc | aca | gag | ttg | caa | act | gag | gaa | aaa | ata | tac | tcg | gaa | aac | ctc | gat | 905 |
| Gly | Thr | Glu | Leu | Gln | Thr | Glu | Glu | Lys | Ile | Tyr | | Glu | Asn | Leu | Asp | |
| | 220 | | | | | 225 | | | | | 230 | | | | | |
| ctt | gag | gac | tca | ctc | tta | caa | agt | ctg | acc | tca | tct | tcc | ttc | aaa | gaa | 953 |
| Leu | Glu | Asp | Ser | Leu | Leu | Gln | Ser | Leu | Thr | Ser | Ser | Ser | Phe | Lys | Glu | |
| 235 | | | | | 240 | | | | 245 | | | | | | 250 | |
| agc | ccc | gga | ggt | tgc | aca | tca | cca | gga | tct | cag | gaa | aag | gtg | ccc | ata | 1001 |
| Ser | Pro | Gly | Gly | Cys | Thr | Ser | Pro | Gly | Ser | Gln | Glu | Lys | Val | Pro | Ile | |
| | | | | 255 | | | | | 260 | | | | | 265 | | |
| aaa | gat | cat | gat | gga | gaa | cct | act | gaa | atc | tgg | gat | tcc | ttg | cta | tca | 1049 |
| Lys | Asp | His | Asp | Gly | Glu | Pro | Thr | Glu | Ile | Trp | Asp | Ser | Leu | Leu | Ser | |
| | | | 270 | | | | | 275 | | | | | 280 | | | |
| aat | gaa | aat | gaa | gga | agt | tct | gtt | ttg | gtg | aac | tgt | gtt | act | cct | gaa | 1097 |
| Asn | Glu | Asn | Glu | Gly | Ser | Ser | Val | Leu | Val | Asn | Cys | Val | Thr | Pro | Glu | |
| | | 285 | | | | | 290 | | | | | 295 | | | | |
| ctc | gag | cag | ccc | aag | gac | ggt | cag | gtg | gca | gct | gac | gac | ctt | gag | gaa | 1145 |
| Leu | Glu | Gln | Pro | Lys | Asp | Gly | Gln | Val | Ala | Ala | Asp | Asp | Leu | Glu | Glu | |
| | 300 | | | | | 305 | | | | | 310 | | | | | |
| gaa | aga | gag | aag | ggt | gga | ttt | aca | gaa | gat | gac | ctc | acc | act | gac | ccg | 1193 |
| Glu | Arg | Glu | Lys | Gly | Gly | Phe | Thr | Glu | Asp | Asp | Leu | Thr | Thr | Asp | Pro | |
| 315 | | | | | 320 | | | | | 325 | | | | | 330 | |
| ctg | ctc | tcc | acg | tcc | ccg | agt | gtc | ata | aca | ccc | act | gag | cca | gca | gag | 1241 |
| Leu | Leu | Ser | Thr | Ser | Pro | Ser | Val | Ile | Thr | Pro | Thr | Glu | Pro | Ala | Glu | |
| | | | | 335 | | | | | 340 | | | | | 345 | | |
| ccg | gcc | aag | aaa | gca | aat | gaa | gac | aga | aac | acg | aag | aat | aaa | aag | aca | 1289 |
| Pro | Ala | Lys | Lys | Ala | Asn | Glu | Asp | Arg | Asn | Thr | Lys | Asn | Lys | Lys | Thr | |
| | | | 350 | | | | | 355 | | | | | 360 | | | |
| acg | aat | aac | aga | gtg | tcc | agt | gcc | tct | ggc | agc | agg | ctg | atg | acc | tct | 1337 |
| Thr | Asn | Asn | Arg | Val | Ser | Ser | Ala | Ser | Gly | Ser | Arg | Leu | Met | Thr | Ser | |
| | | 365 | | | | | 370 | | | | | 375 | | | | |
| gag | ttt | tta | aag | aga | tcc | ggt | ccc | aca | aaa | aga | agt | cca | tct | gca | gct | 1385 |
| Glu | Phe | Leu | Lys | Arg | Ser | Gly | Pro | Thr | Lys | Arg | Ser | Pro | Ser | Ala | Ala | |
| | 380 | | | | | 385 | | | | | 390 | | | | | |
| acc | tcc | tca | cac | tat | tta | ggg | agt | ttg | aaa | gtc | ttg | gac | cag | aag | caa | 1433 |
| Thr | Ser | Ser | His | Tyr | Leu | Gly | Ser | Leu | Lys | Val | Leu | Asp | Gln | Lys | Gln | |
| | 395 | | | | 400 | | | | | 405 | | | | | 410 | |
| cca | cgg | aag | cag | agc | cta | gag | cca | gac | aag | gct | gat | cac | ata | agg | gca | 1481 |
| Pro | Arg | Lys | Gln | Ser | Leu | Glu | Pro | Asp | Lys | Ala | Asp | His | Ile | Arg | Ala | |
| | | | | 415 | | | | | 420 | | | | | 425 | | |

s644PCT88.ST25

| | |
|---|------|
| gct gtt tat cag gag tgg tta gaa aag aaa aat gtg tat tta cat gaa | 1529 |
| Ala Val Tyr Gln Glu Trp Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu | |
| 430 435 440 | |
| atg cac aga ata aaa aga att gaa agc gaa aac ttg agg atc caa aat | 1577 |
| Met His Arg Ile Lys Arg Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn | |
| 445 450 455 | |
| gaa cag aaa aaa gct gct aag aga gag gaa gcc ctg gca tca ttt gag | 1625 |
| Glu Gln Lys Lys Ala Ala Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu | |
| 460 465 470 | |
| gcc tgg aag gca atg aaa gag aag gaa gca aag aga ata gct gca aaa | 1673 |
| Ala Trp Lys Ala Met Lys Glu Lys Glu Ala Lys Arg Ile Ala Ala Lys | |
| 475 480 485 490 | |
| aag agg ctg gag gaa aag aac aag aag aaa aca gaa gaa gaa aat gcc | 1721 |
| Lys Arg Leu Glu Glu Lys Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala | |
| 495 500 505 | |
| atg agg aaa ggc gag gcc ctg caa gca ttt gaa aaa tgg aaa gag aaa | 1769 |
| Met Arg Lys Gly Glu Ala Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys | |
| 510 515 520 | |
| aag cta gaa tac ctc aaa gag aag acc agg agg gag aaa gaa tat gaa | 1817 |
| Lys Leu Glu Tyr Leu Lys Glu Lys Thr Arg Arg Glu Lys Glu Tyr Glu | |
| 525 530 535 | |
| aga gca aag aaa cag aaa gaa gag gaa gcg gtt gct gag aaa aag aaa | 1865 |
| Arg Ala Lys Lys Gln Lys Glu Glu Glu Ala Val Ala Glu Lys Lys Lys | |
| 540 545 550 | |
| gac agt tta act gct ttt gaa aaa tgg agt gag aga aag gaa gct ctc | 1913 |
| Asp Ser Leu Thr Ala Phe Glu Lys Trp Ser Glu Arg Lys Glu Ala Leu | |
| 555 560 565 570 | |
| ctc aag caa aag gag aag gag aaa ata aat gag aga aga aag gaa gag | 1961 |
| Leu Lys Gln Lys Glu Lys Glu Lys Ile Asn Glu Arg Arg Lys Glu Glu | |
| 575 580 585 | |
| ctg aag aga gcc gag aag aaa gac aaa gac aag caa gcc atc agt gaa | 2009 |
| Leu Lys Arg Ala Glu Lys Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Ser Glu | |
| 590 595 600 | |
| tac gaa aag tgg ctg gaa aag aaa gaa agg caa gaa aga att gaa cgg | 2057 |
| Tyr Glu Lys Trp Leu Glu Lys Lys Glu Arg Gln Glu Arg Ile Glu Arg | |
| 605 610 615 | |
| aaa cag aag aag cgc cac tcc ttc ctt gag agc gag aca cac cca cca | 2105 |
| Lys Gln Lys Lys Arg His Ser Phe Leu Glu Ser Glu Thr His Pro Pro | |
| 620 625 630 | |
| tgg agt cct ccg agc aga act gcg ccc tca aaa gta ttt tga | 2147 |
| Trp Ser Pro Pro Ser Arg Thr Ala Pro Ser Lys Val Phe | |
| 635 640 645 | |
| tgtttctggt tcttgatttt tttttcagtt caccaactgt actcatggat ttaaaacgag | 2207 |
| tcatctcatt atttgtgggt agaagactct atgtcacttc cctgcaggag cttctgtgga | 2267 |
| gcatgaaaga gatactttgc agtttaatca gtggaaacat tttctgaagt gtcctcatca | 2327 |
| gtttgctggg acaatccaga cgcatgaagc tttattatga cctgaacagt ctggtgtggg | 2387 |
| gtgattcgtg gtcactgtcg ctgagttcgg agtcttttta aagaatgttt gatcccacta | 2447 |
| atgaaagaat gccagctaga taccacaatc gtagagatga ctcggtctgt ggaagtctgt | 2507 |

s644PCT88.ST25

gcttctagag tgtagtttgg gcattgaagg tccctggaga ccatgggcat gttatctctt 2567
 ctaactccag ttcttcaggt cacagaagta tctttgctgt gcaagttatc gactcagtca 2627
 gttgaggcca cagaactcta gtcagtcact ttagtaaaga actttgccat aggggtttaat 2687
 ctcggtgtgg tttgccttct tgaggcttac ctgacaatcg tagccacctc tataatgggc 2747
 tcacttctgg aatgttcttt 2767

<210> 46

<211> 647

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Met Ser Asp Glu Ile Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro
 1 5 10 15

Lys Ala Thr Lys Arg Thr Ser Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile
 20 25 30

Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe
 35 40 45

Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Glu Phe Ser Asp Thr Ser Thr
 50 55 60

Asp Glu Ser Leu Val Arg Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp
 65 70 75 80

Asp Glu Glu Lys Asn Ser Pro Arg Leu Ser Phe Leu Lys Thr Lys Lys
 85 90 95

Val Asn Arg Ala Ile Ser Asn Asp Ala Leu Asp Ser Ser Thr Pro Gly
 100 105 110

Ser Glu Gly Ser Ser Pro Asp Ala Gln Glu Asp Val Thr Gly Asp Ser
 115 120 125

Leu Pro Lys Ser Gln Asn Asp Asp Arg Glu Val Gly Arg Glu Ile Ile
 130 135 140

Thr Val Lys Pro Thr Pro Arg Met His Pro Val Lys Arg Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Ser Gly Glu Thr Ser Ser Gly Leu Asp Ala Asp Gly His Phe Lys Pro
 165 170 175

s644PCT88.ST25

Ser Pro Gln Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Ser Ser His Thr Glu Glu
180 185 190

Gly Val Arg Pro Gly Val Asp Lys Glu His Ser Ile Ser Glu Ala Ser
195 200 205

Ala Pro Thr Pro Ser Leu Pro Arg Gln Asn Gly Thr Glu Leu Gln Thr
210 215 220

Glu Glu Lys Ile Tyr Ser Glu Asn Leu Asp Leu Glu Asp Ser Leu Leu
225 230 235 240

Gln Ser Leu Thr Ser Ser Ser Phe Lys Glu Ser Pro Gly Gly Cys Thr
245 250 255

Ser Pro Gly Ser Gln Glu Lys Val Pro Ile Lys Asp His Asp Gly Glu
260 265 270

Pro Thr Glu Ile Trp Asp Ser Leu Leu Ser Asn Glu Asn Glu Gly Ser
275 280 285

Ser Val Leu Val Asn Cys Val Thr Pro Glu Leu Glu Gln Pro Lys Asp
290 295 300

Gly Gln Val Ala Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu Arg Glu Lys Gly Gly
305 310 315 320

Phe Thr Glu Asp Asp Leu Thr Thr Asp Pro Leu Leu Ser Thr Ser Pro
325 330 335

Ser Val Ile Thr Pro Thr Glu Pro Ala Glu Pro Ala Lys Lys Ala Asn
340 345 350

Glu Asp Arg Asn Thr Lys Asn Lys Lys Thr Thr Asn Asn Arg Val Ser
355 360 365

Ser Ala Ser Gly Ser Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Arg Ser
370 375 380

Gly Pro Thr Lys Arg Ser Pro Ser Ala Ala Thr Ser Ser His Tyr Leu
385 390 395 400

Gly Ser Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Gln Pro Arg Lys Gln Ser Leu
405 410 415

Glu Pro Asp Lys Ala Asp His Ile Arg Ala Ala Val Tyr Gln Glu Trp
420 425 430

Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His Arg Ile Lys Arg
435 440 445

s644PCT88.ST25

Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln Lys Lys Ala Ala
 450 455 460

Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp Lys Ala Met Lys
 465 470 475 480

Glu Lys Glu Ala Lys Arg Ile Ala Ala Lys Lys Arg Leu Glu Glu Lys
 485 490 495

Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala Met Arg Lys Gly Glu Ala
 500 505 510

Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Leu Glu Tyr Leu Lys
 515 520 525

Glu Lys Thr Arg Arg Glu Lys Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln Lys
 530 535 540

Glu Glu Glu Ala Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Ser Leu Thr Ala Phe
 545 550 555 560

Glu Lys Trp Ser Glu Arg Lys Glu Ala Leu Leu Lys Gln Lys Glu Lys
 565 570 575

Glu Lys Ile Asn Glu Arg Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu Lys
 580 585 590

Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Ser Glu Tyr Glu Lys Trp Leu Glu
 595 600 605

Lys Lys Glu Arg Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys Arg His
 610 615 620

Ser Phe Leu Glu Ser Glu Thr His Pro Pro Trp Ser Pro Pro Ser Arg
 625 630 635 640

Thr Ala Pro Ser Lys Val Phe
 645

<210> 47

<211> 647

<212> PRT

<213> artificial sequence

<400> 47

Met Ser Asp Glu Ile Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro
 1 5 10 15

s644PCT88.ST25

Lys Ala Thr Lys Arg Thr Ser Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile
 20 25 30

Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe
 35 40 45

Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Glu Phe Ser Asp Thr Ser Thr
 50 55 60

Asp Glu Ser Leu Val Arg Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp
 65 70 75 80

Asp Glu Glu Lys Asn Ser Pro Arg Leu Ser Phe Leu Lys Thr Lys Lys
 85 90 95

Val Asn Arg Ala Ile Ser Asn Asp Ala Leu Asp Ser Ser Thr Pro Gly
 100 105 110

Ser Glu Gly Ser Ser Pro Asp Ala Gln Glu Asp Val Thr Gly Asp Ser
 115 120 125

Leu Pro Lys Ser Gln Asn Asp Asp Arg Glu Val Gly Arg Glu Ile Ile
 130 135 140

Thr Val Lys Pro Thr Pro Arg Met His Pro Val Lys Arg Ser Thr Ser
 145 150 155 160

Ser Gly Glu Thr Ser Ser Gly Leu Asp Ala Asp Gly His Phe Lys Pro
 165 170 175

Ser Pro Gln Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Ser Ser His Thr Glu Glu
 180 185 190

Gly Val Arg Pro Gly Val Asp Lys Glu His Ser Ile Ser Glu Ala Ser
 195 200 205

Ala Pro Thr Pro Ser Leu Pro Arg Gln Asn Gly Thr Glu Leu Gln Thr
 210 215 220

Glu Glu Lys Ile Tyr Ser Glu Asn Leu Asp Leu Glu Asp Ser Leu Leu
 225 230 235 240

Gln Ser Leu Thr Ser Ser Ser Phe Lys Glu Ser Pro Gly Gly Cys Thr
 245 250 255

Ser Pro Gly Ser Gln Glu Lys Val Pro Ile Lys Asp His Asp Gly Glu
 260 265 270

Pro Thr Glu Ile Trp Asp Ser Leu Leu Ser Asn Glu Asn Glu Gly Ser
 275 280 285

s644PCT88.ST25

Ser Val Leu Val Asn Cys Val Thr Pro Glu Leu Glu Gln Pro Lys Asp
 290 295 300

Gly Gln Val Ala Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu Arg Glu Lys Gly Gly
 305 310 315 320

Phe Thr Glu Asp Asp Leu Thr Thr Asp Pro Leu Leu Ser Thr Ser Pro
 325 330 335

Ser Val Ile Thr Pro Thr Glu Pro Ala Glu Pro Ala Lys Lys Ala Asn
 340 345 350

Glu Asp Arg Asn Thr Lys Asn Lys Lys Thr Thr Asn Asn Arg Val Ser
 355 360 365

Ser Ala Ser Gly Ser Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Arg Ser
 370 375 380

Gly Pro Thr Lys Arg Ser Pro Ser Ala Ala Thr Ser Ser His Tyr Leu
 385 390 395 400

Gly Ser Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Gln Pro Arg Lys Gln Ser Leu
 405 410 415

Glu Pro Asp Lys Ala Asp His Ile Arg Ala Ala Val Tyr Gln Glu Trp
 420 425 430

Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His Arg Ile Lys Arg
 435 440 445

Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln Lys Lys Ala Ala
 450 455 460

Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp Lys Ala Met Lys
 465 470 475 480

Glu Lys Glu Ala Lys Arg Ile Ala Ala Lys Lys Arg Leu Glu Glu Lys
 485 490 495

Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala Met Arg Lys Gly Glu Ala
 500 505 510

Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Leu Glu Tyr Leu Lys
 515 520 525

Glu Lys Thr Arg Arg Glu Lys Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln Lys
 530 535 540

Glu Glu Glu Ala Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Ser Leu Thr Ala Phe
 545 550 555 560

s644PCT88.ST25

Glu Lys Trp Ser Glu Arg Lys Glu Ala Leu Leu Lys Gln Lys Glu Lys
 565 570 575

Glu Lys Ile Asn Glu Arg Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu Lys
 580 585 590

Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Ser Glu Tyr Glu Lys Trp Leu Glu
 595 600 605

Lys Lys Glu Arg Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys Arg His
 610 615 620

Ser Phe Leu Glu Ser Glu Thr His Pro Pro Trp Ser Pro Pro Ser Arg
 625 630 635 640

Thr Ala Pro Ser Lys Val Phe
 645

<210> 48

<211> 344

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> hASAP peptide mutant 411-647

<400> 48

Glu Ser Gln Val Thr Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu Lys Ala Lys Ala
 1 5 10 15

Glu Leu Ile Met Asp Asp Asp Arg Thr Val Asp Pro Leu Leu Ser Lys
 20 25 30

Ser Gln Ser Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ala Thr Ala Ser Ser Lys Lys
 35 40 45

Thr Ile Glu Asp Arg Asn Ile Lys Asn Lys Lys Ser Thr Asn Asn Arg
 50 55 60

Ala Ser Ser Ala Ser Ala Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Lys
 65 70 75 80

Ser Ser Ser Lys Arg Arg Thr Pro Ser Thr Thr Thr Ser Ser His Tyr
 85 90 95

Leu Gly Thr Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Pro Ser Gln Lys Gln Ser
 100 105 110

s644PCT88.ST25

Ile Glu Pro Asp Arg Ala Asp Asn Ile Arg Ala Ala Val Tyr Gln Glu
 115 120 125

Trp Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His Arg Ile Lys
 130 135 140

Arg Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln Lys Lys Ala
 145 150 155 160

Ala Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp Lys Ala Met
 165 170 175

Lys Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys Lys Arg Leu Glu Glu
 180 185 190

Lys Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala Ala Arg Lys Gly Glu
 195 200 205

Ala Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Met Glu Tyr Leu
 210 215 220

Lys Glu Lys Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu Arg Ala Lys Lys Gln
 225 230 235 240

Lys Glu Glu Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Asn Leu Thr Ala
 245 250 255

Val Glu Lys Trp Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe Phe Lys Gln Lys Lys
 260 265 270

Lys Glu Lys Ile Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg Ala Glu
 275 280 285

Lys Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu Tyr Glu Lys Trp Leu
 290 295 300

Glu Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys Lys Arg
 305 310 315 320

His Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro Trp Ser Pro Pro Ser
 325 330 335

Arg Thr Val Phe Ala Lys Val Phe
 340

<210> 49

<211> 237

<212> PRT

<213> artificial sequence

s644PCT88.ST25

<220>

<223> hASAP mutant 411-647

<400> 49

Ser Gln Lys Gln Ser Ile Glu Pro Asp Arg Ala Asp Asn Ile Arg Ala
 1 5 10 15

Ala Val Tyr Gln Glu Trp Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu
 20 25 30

Met His Arg Ile Lys Arg Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn
 35 40 45

Glu Gln Lys Lys Ala Ala Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu
 50 55 60

Ala Trp Lys Ala Met Lys Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys
 65 70 75 80

Lys Arg Leu Glu Glu Lys Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala
 85 90 95

Ala Arg Lys Gly Glu Ala Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys
 100 105 110

Lys Met Glu Tyr Leu Lys Glu Lys Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu
 115 120 125

Arg Ala Lys Lys Gln Lys Glu Glu Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Lys
 130 135 140

Asp Asn Leu Thr Ala Val Glu Lys Trp Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe
 145 150 155 160

Phe Lys Gln Lys Lys Lys Glu Lys Ile Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu
 165 170 175

Leu Lys Arg Ala Glu Lys Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu
 180 185 190

Tyr Glu Lys Trp Leu Glu Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg
 195 200 205

Lys Gln Lys Lys Arg His Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro
 210 215 220

Trp Ser Pro Pro Ser Arg Thr Val Phe Ala Lys Val Phe
 225 230 235

s644PCT88.ST25

<210> 50

<211> 170

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> hASAP mutant 478-647

<400> 50

Ala Met Lys Glu Lys Glu Ala Lys Lys Ile Ala Ala Lys Lys Arg Leu
 1 5 10 15

Glu Glu Lys Asn Lys Lys Lys Thr Glu Glu Glu Asn Ala Ala Arg Lys
 20 25 30

Gly Glu Ala Leu Gln Ala Phe Glu Lys Trp Lys Glu Lys Lys Met Glu
 35 40 45

Tyr Leu Lys Glu Lys Asn Arg Lys Glu Arg Glu Tyr Glu Arg Ala Lys
 50 55 60

Lys Gln Lys Glu Glu Glu Thr Val Ala Glu Lys Lys Lys Asp Asn Leu
 65 70 75 80

Thr Ala Val Glu Lys Trp Asn Glu Lys Lys Glu Ala Phe Phe Lys Gln
 85 90 95

Lys Lys Lys Glu Lys Ile Asn Glu Lys Arg Lys Glu Glu Leu Lys Arg
 100 105 110

Ala Glu Lys Lys Asp Lys Asp Lys Gln Ala Ile Asn Glu Tyr Glu Lys
 115 120 125

Trp Leu Glu Asn Lys Glu Lys Gln Glu Arg Ile Glu Arg Lys Gln Lys
 130 135 140

Lys Arg His Ser Phe Leu Glu Ser Glu Ala Leu Pro Pro Trp Ser Pro
 145 150 155 160

Pro Ser Arg Thr Val Phe Ala Lys Val Phe
 165 170

<210> 51

<211> 477

<212> PRT

<213> artificial sequence

s644PCT88.ST25

<220>

<223> hASAP mutant 1-477

<400> 51

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro
1 5 10 15

Lys Val Thr Lys Arg Thr Thr Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile
20 25 30

Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe
35 40 45

Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala
50 55 60

Asp Glu Asn Ser Val Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp
65 70 75 80

Asp Glu Glu Lys Asn Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys
85 90 95

Ser Asn Gly Asn Ile Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn
100 105 110

Glu Glu Glu Met Ala Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser
115 120 125

Phe Ser Glu Ser Gln Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile
130 135 140

Lys Met Lys Pro Lys Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser
145 150 155 160

Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro
165 170 175

Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp
180 185 190

Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His
195 200 205

Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala
210 215 220

Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu Asp Ser Cys Leu
225 230 235 240

s644PCT88.ST25

Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ser Leu Lys Gln Ile Leu Gly Asp Ser Phe
 245 250 255

Ser Pro Gly Ser Glu Gly Asn Ala Ser Gly Lys Asp Pro Asn Glu Glu
 260 265 270

Ile Thr Glu Asn His Asn Ser Leu Lys Ser Asp Glu Asn Lys Glu Asn
 275 280 285

Ser Phe Ser Ala Asp His Val Thr Thr Ala Val Glu Lys Ser Lys Glu
 290 295 300

Ser Gln Val Thr Ala Asp Asp Leu Glu Glu Glu Lys Ala Lys Ala Glu
 305 310 315 320

Leu Ile Met Asp Asp Asp Arg Thr Val Asp Pro Leu Leu Ser Lys Ser
 325 330 335

Gln Ser Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ala Thr Ala Ser Ser Lys Lys Thr
 340 345 350

Ile Glu Asp Arg Asn Ile Lys Asn Lys Lys Ser Thr Asn Asn Arg Ala
 355 360 365

Ser Ser Ala Ser Ala Arg Leu Met Thr Ser Glu Phe Leu Lys Lys Ser
 370 375 380

Ser Ser Lys Arg Arg Thr Pro Ser Thr Thr Thr Ser Ser His Tyr Leu
 385 390 395 400

Gly Thr Leu Lys Val Leu Asp Gln Lys Pro Ser Gln Lys Gln Ser Ile
 405 410 415

Glu Pro Asp Arg Ala Asp Asn Ile Arg Ala Ala Val Tyr Gln Glu Trp
 420 425 430

Leu Glu Lys Lys Asn Val Tyr Leu His Glu Met His Arg Ile Lys Arg
 435 440 445

Ile Glu Ser Glu Asn Leu Arg Ile Gln Asn Glu Gln Lys Lys Ala Ala
 450 455 460

Lys Arg Glu Glu Ala Leu Ala Ser Phe Glu Ala Trp Lys
 465 470 475

<210> 52

<211> 418

<212> PRT

<213> artificial sequence

s644PCT88.ST25

<220>

<223> hASAP mutant 1-418

<400> 52

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro
 1 5 10 15

Lys Val Thr Lys Arg Thr Thr Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile
 20 25 30

Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe
 35 40 45

Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala
 50 55 60

Asp Glu Asn Ser Val Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp
 65 70 75 80

Asp Glu Glu Lys Asn Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys
 85 90 95

Ser Asn Gly Asn Ile Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn
 100 105 110

Glu Glu Glu Met Ala Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser
 115 120 125

Phe Ser Glu Ser Gln Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile
 130 135 140

Lys Met Lys Pro Lys Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser
 145 150 155 160

Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro
 165 170 175

Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp
 180 185 190

Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His
 195 200 205

Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala
 210 215 220

Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu Asp Ser Cys Leu
 225 230 235 240

<210> 53

<211> 303

<212> PRT

<213> artificial sequence

<220>

<223> hASAP mutant 1-303

<400> 53

Met Ser Asp Glu Val Phe Ser Thr Thr Leu Ala Tyr Thr Lys Ser Pro
1 5 10 15

s644PCT88.ST25

Lys Val Thr Lys Arg Thr Thr Phe Gln Asp Glu Leu Ile Arg Ala Ile
 20 25 30

Thr Ala Arg Ser Ala Arg Gln Arg Ser Ser Glu Tyr Ser Asp Asp Phe
 35 40 45

Asp Ser Asp Glu Ile Val Ser Leu Gly Asp Phe Ser Asp Thr Ser Ala
 50 55 60

Asp Glu Asn Ser Val Asn Lys Lys Met Asn Asp Phe His Ile Ser Asp
 65 70 75 80

Asp Glu Glu Lys Asn Pro Ser Lys Leu Leu Phe Leu Lys Thr Asn Lys
 85 90 95

Ser Asn Gly Asn Ile Thr Lys Asp Glu Pro Val Cys Ala Ile Lys Asn
 100 105 110

Glu Glu Glu Met Ala Pro Asp Gly Cys Glu Asp Ile Val Val Lys Ser
 115 120 125

Phe Ser Glu Ser Gln Asn Lys Asp Glu Glu Phe Glu Lys Asp Lys Ile
 130 135 140

Lys Met Lys Pro Lys Pro Arg Ile Leu Ser Ile Lys Ser Thr Ser Ser
 145 150 155 160

Ala Glu Asn Asn Ser Leu Asp Thr Asp Asp His Phe Lys Pro Ser Pro
 165 170 175

Trp Pro Arg Ser Met Leu Lys Lys Lys Ser His Met Glu Glu Lys Asp
 180 185 190

Gly Leu Glu Asp Lys Glu Thr Ala Leu Ser Glu Glu Leu Glu Leu His
 195 200 205

Ser Ala Pro Ser Ser Leu Pro Thr Pro Asn Gly Ile Gln Leu Glu Ala
 210 215 220

Glu Lys Lys Ala Phe Ser Glu Asn Leu Asp Pro Glu Asp Ser Cys Leu
 225 230 235 240

Thr Ser Leu Ala Ser Ser Ser Leu Lys Gln Ile Leu Gly Asp Ser Phe
 245 250 255

Ser Pro Gly Ser Glu Gly Asn Ala Ser Gly Lys Asp Pro Asn Glu Glu
 260 265 270

Ile Thr Glu Asn His Asn Ser Leu Lys Ser Asp Glu Asn Lys Glu Asn
 275 280 285

s644PCT88.ST25

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Phe | Ser | Ala | Asp | His | Val | Thr | Thr | Ala | Val | Glu | Lys | Ser | Lys |
| 290 | | | | | | 295 | | | | | 300 | | | |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.